



**Bruna Cristina Duarte**  
**Delgado David**

**Inativação fotodinâmica de bactérias e fungos com  
fotossensibilizadores naturais e sintéticos**





**Bruna Cristina Duarte  
Delgado David**

**Inativação fotodinâmica de bactérias e fungos com  
fotossensibilizadores naturais e sintéticos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação científica da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



**o júri**

presidente

**Professora Doutora Sónia Alexandra Velho Mendo Barroso**

Professora Auxiliar C/ Agregação

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

vogais

**Doutora Kelly Aparecida Dias de Freitas Castro** (arguente)

Investigadora de Pós Doutoramento, Departamento de Química

Universidade Federal do Paraná, Brasil.

**Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha** (orientadora)

Professora Auxiliar

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



## agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, a minha irmã, ao Erick por todo apoio, carinho e compreensão durante este percurso, tornando mais fácil esta caminhada.

Um especial apreço à professora Dr<sup>a</sup> Ângela Cunha pela orientação científica, por toda ajuda durante este trabalho e pela transmissão de conhecimentos de forma clara e esclarecedora.

À Professora Doutora Maria do Amparo Faustino, co-orientadora da tese, por aceitar colaborar neste trabalho, pela disponibilidade e pelo fornecimento da porfirina.

Gostaria também de agradecer ao investigador José Delgado e à Inovapotek pelo fornecimento do creme TMPy-P.

À professora Adelaide Almeida e ao professor Artur Alves pela cedência das culturas de *Staphylococcus aureus* metilino resistente e de *Lasioidiploidia Theobromae* respetivamente.

À Sara Fernandes pelos resultados dos ensaios de inativação de *Staphylococcus aureus* (células livres) com a porfirina tetracatiónica, nas concentrações de 1 e 5  $\mu M$ .

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada pela simpatia, boa disposição, pelas sugestões e apoio.

As minhas colegas e amigas Nádia, Tatiana e Vânia pela amizade, apoio e os bons momentos passados durante estes dois anos.

As minhas colegas de casa e amigas Crislaine, Lara e Lendi pela amizade e por todo apoio.

À técnica Helena Dias, pelo apoio técnico ao trabalho laboratorial.

Este trabalho teve apoio material do CESAM através do projeto FCT UID/MAR/LA0017/2013.





**Palavras chave:**

*Inativação fotodinâmica, biofilmes bacterianos, fungos fitopatogénicos, curcumina, riboflavina, porfirina, azul de toluidina.*

**Resumo**

A inativação fotodinâmica de microrganismos (PDI) baseia-se na combinação de três elementos não tóxicos: uma molécula fotossensibilizadora (PS), luz e oxigénio. O PS, quando excitado pela luz na presença de oxigénio, leva à geração de espécies reativas de oxigénio tóxicas para as células, que causam danos celulares irreversíveis e letais. Esta abordagem tem sido considerada como uma alternativa promissora a outros métodos de inativação de microrganismos. No entanto, o alargamento da sua aplicação, é ainda limitado pela baixa suscetibilidade dos microrganismos quando organizados em biofilmes, pela redução da eficiência dos PS quando incorporados em formulações para aplicação direta e pela disponibilidade de PS não tóxicos compatíveis com matrizes alimentares. Para este trabalho foram definidos os seguintes objetivos específicos: (a) avaliar a eficiência de curcumina na inativação de biofilmes de microrganismos relevantes como patogénicos alimentares; (b) avaliar a eficiência de PS naturais e sintéticos na inativação de fungos fitopatogénicos ou agentes de deterioração de frutos; (c) avaliar o efeito da incorporação de PS de referência (porfirina catiónica) em géis e cremes para aplicação superficial. Assim o fotossensibilizador natural curcumina não causou inativação significativa (0,6 Log) em biofilmes de *Staphylococcus aureus*. No entanto, a curcumina a 200  $\mu M$  conduz uma redução significativa (3,4 Log), na concentração de células viáveis em biofilmes de *L. innocua*, após irradiação com luz azul (270  $J.cm^{-2}$ ). Os biofilmes de *L. innocua*, usada como modelo do patogénico alimentar *L. monocytogenes* revelaram maior suscetibilidade à inativação fotodinâmica com curcumina.



Pelo contrário, o crescimento dos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Botrytis cinerea*, usados como modelo de fungos patogénicos da vinha e agentes de deterioração de frutos, não foi significativamente atenuado na presença de curcumina e riboflavina, com exposição à luz solar. A porfirina tetracatiónica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante azul de toluidina causaram atraso e atenuação no crescimento do micélio de ambos os fungos, sendo a porfirina mais eficaz do que o corante. O efeito fotossensibilizador foi maior em *L. theobromae* já que a estirpe de *B. cinerea* usada neste trabalho sofreu atenuação do crescimento por ação direta da luz solar, mesmo na ausência de PS. A incorporação de uma porfirina catiónica em formulações para aplicação tópica (cremes) atenuou significativamente a sua eficiência na inativação de células livres, relativamente à eficiência de inativação do mesmo PS em solução aquosa. No entanto, conseguiu-se inativação completa de suspensões de *Staphylococcus aureus* (MSSA e MRSA) com um creme contendo 50  $\mu M$  desta porfirina catiónica e irradiação com luz branca (540  $J.cm^{-2}$ ).

A curcumina revela elevado potencial como fotossensibilizador compatível com alimentos, podendo ser aplicado no controle de *Listeria* em alimentos e superfícies de contacto com alimentos. No entanto, não se revelou eficaz no controle do crescimento de fungos associados à biodeterioração de frutos. Os resultados obtidos com fotossensibilizadores sintéticos, nomeadamente da família das porfirinas, permitem perspetivar uma alternativa de baixa toxicidade ambiental a outros antifúngicos de uso agrícola, com possível aplicação no tratamento de doenças do tronco da videira e de outras árvores de fruto. A incorporação de PS em formulações adequadas à forma de aplicação, nomeadamente cremes para aplicação tópica, tem impacto negativo na eficiência de inativação que pode, no entanto, ser compensado aumentando a concentração de PS e a dose de energia aplicada.



**Keywords:**

*photodynamic inactivation, microbial biofilms, phytopathogenic fungi, curcumine, riboflavine, porphyrin, toluidine blue.*

**Abstract**

The photodynamic inactivation of microorganisms (PDI) is based on the combination of three non-toxic elements: a photosensitizer (PS), light and oxygen. When the PS is excited by light, in the presence of oxygen, cytotoxic reactive oxygen species are formed, leading to irreversible damage and cell death. This approach has been regarded as a promising alternative to other methods of inactivation of microorganisms. However, the expansion of its application to contexts in which microbial inactivation is intended, is still limited by the low susceptibility of microbial biofilms, by the availability of non-toxic food-grade PS and also by the attenuation of the photosensitization efficiency of PS when incorporated in formulations for topic application. This work aimed at the following objectives: (a) to evaluate the efficiency of curcumin for the inactivation of biofilms of relevant bacterial food pathogens; (b) to evaluate the efficiency of natural and synthetic PS on the inactivation of phytopathogenic fungi or fungal agents of fruit deterioration; (c) to evaluate the effect of incorporation of PS (cationic porphyrin) in gels and creams for topic application. The natural photosensitizer curcumin failed to significantly inactivate (0.6 Log) biofilms of *Staphylococcus aureus*. However, 200  $\mu$ M of curcumin caused a reduction of approximately (3,4 Log) log in the concentration of viable cells in biofilms of *Listeria innocua*, upon irradiation with blue light (270 J.cm<sup>-2</sup>). The biofilms of *L. innocua*, used as a model of food pathogen *L. monocytogenes* showed greater susceptibility to photodynamic inactivation with curcumin than with a cationic porphyrin used as reference PS.



On the contrary, the growth of the fungi *Botrytis cinerea* and *Lasiodiplodia theobromae*, used as models of vine pathogens and fruit decay agents, was not significantly attenuated in the presence of curcumin and riboflavin, upon exposure to sunlight. The tetracationic porphyrin Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and toluidine blue O caused delay and attenuation of mycelium growth in both fungi, being the porphyrin more effective than the dye. The photosensitizing effect was more obvious in *L. theobromae* as the *B. cinerea* strain used in this study suffered growth attenuation by direct action of sunlight, even in the absence of PS. The incorporation of a cationic porphyrin in topical formulations (creams) significantly reduce the efficiency of inactivation of planktonic cells and bacterial biofilms, when compared to the effect of aqueous solutions of the free PS. However, complete inactivation of *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA) was achieved with a cream containing 50  $\mu\text{M}$  of a cationic porphyrin (Tetra-Py<sup>+</sup> - Me) and irradiation with white light (540 J.cm<sup>-2</sup>). Curcumin shows high potential as a food-grade photosensitizer and may be applied in the control of *Listeria* in food products and food contacting surfaces. However, it has not proven effective in controlling the proliferation of fungi associated with the biodeterioration of fruits. The results obtained with a synthetic photosensitizer (cationic porphyrin) may, however, be regarded as a promising low-toxicity alternative to current antifungals used in agriculture. The incorporation of a PS in appropriate formulations, namely creams for topical application, has a negative impact on the efficiency of inactivation that can be compensated by increasing the concentration of PS and the dose of applied energy.





# Conteúdo

<b>Conteúdo</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xv</b>
<b>1 Inativação fotodinâmica</b>	<b>1</b>
1.1 Terapia fotodinâmica . . . . .	1
1.2 Mecanismo de inativação . . . . .	2
1.3 Fatores determinantes de eficiência de inativação . . . . .	3
1.3.1 Microrganismos . . . . .	3
1.3.2 Fotossensibilizadores . . . . .	4
1.4 Fonte de luz . . . . .	9
1.5 Vantagens e limitações de terapia fotodinâmica . . . . .	10
1.6 Objetivo geral . . . . .	11
1.7 Bibliografia . . . . .	12
<b>2 Inativação fotodinâmica de biofilmes alimentares com fotossensibilizadores naturais e sintéticos</b>	<b>17</b>
2.1 Biofilmes microbianos . . . . .	18
2.2 Materiais e métodos . . . . .	24
2.2.1 Microrganismos e condições de crescimento . . . . .	24
2.2.2 Preparação dos biofilmes bacterianos . . . . .	25



2.2.3	Fotossensibilizadores . . . . .	25
2.2.4	Condições de irradiação e controlos . . . . .	26
2.2.5	Inativação fotodinâmica de biofilmes . . . . .	27
2.2.6	Inativação fotodinâmica de células planctónicas . . . . .	28
2.2.7	Análise estatística . . . . .	28
2.3	Resultados . . . . .	28
2.3.1	Inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos . . . . .	28
2.3.2	Inativação fotodinâmica das células planctónicas . . . . .	30
2.4	Discussão e conclusão . . . . .	31
2.5	Bibliografia . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Formulação semi-sólida de um fotossensibilizador para aplicação tópica</b>	<b>41</b>
3.1	Introdução . . . . .	42
3.2	Materiais e métodos . . . . .	44
3.2.1	Microrganismos e condições de crescimento . . . . .	44
3.2.2	Formulação semi-sólida . . . . .	45
3.2.3	Condições de irradiação . . . . .	46
3.2.4	Ensaio de inativação fotodinâmica com cremes . . . . .	46
3.2.5	Análise estatística . . . . .	47
3.3	Resultados . . . . .	47
3.4	Discussão e conclusão . . . . .	50
3.5	Bibliografia . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Inativação fotodinâmica de fungos fitopatogénicos</b>	<b>57</b>
4.1	Introdução . . . . .	58
4.2	Materiais e métodos . . . . .	62
4.2.1	Microrganismos e condições de crescimento . . . . .	62
4.2.2	Fotossensibilizadores . . . . .	62
4.2.3	Ensaio de inativação fotodinâmica . . . . .	63
4.2.4	Análise estatística . . . . .	64
4.3	Resultados . . . . .	64



4.4	Discussão e conclusão . . . . .	67
4.5	Bibliografia . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Conclusão geral</b>	<b>75</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>77</b>



# Lista de Figuras

1.1	Representação esquemática dos mecanismos de inativação fotodinâmica (Calixto et al., 2016). . . . .	3
1.2	Estrutura química dos fotossensibilizadores da primeira geração. . . . .	6
1.3	Estrutura química de fotossensibilizadores da segunda geração. . . . .	6
1.4	Estrutura química da curcumina e respetivos derivados. . . . .	7
1.5	Estrutura química de riboflavina. . . . .	9
2.1	Estrutura química da curcumina e da porfirina tetracatiónica. . . . .	26
2.2	Inativação fotodinâmica de biofilmes de <i>Listeria innocua</i> 200 $\mu M$ (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> 100 $\mu M$ (B) com curcumina e irradiação com luz azul ( $150 mW cm^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes. . . . .	29
2.3	Inativação fotodinâmica de biofilmes de <i>Listeria innocua</i> 10 e 20 $\mu M$ (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> 5 $\mu M$ (B) com a porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me e irradiação com luz branca ( $150 mW cm^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondem a 3 ensaios independentes. No gráfico B as barras de erro correspondem às réplicas analíticas de um só ensaio. . . . .	30





2.4	Inativação fotodinâmica de células livres de <i>Listeria innocua</i> 100 $\mu M$ (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> 100 $\mu M$ (B) com curcumina e irradiação com luz azul (150 $mW cm^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes. . . . .	31
2.5	Inativação fotodinâmica de células livres de <i>Listeria innocua</i> 1 $\mu M$ (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> 1 e 5 $\mu M$ (B) com Tetra-Py <sup>+</sup> -Me e irradiação com luz branca (300–700 nm) (150 $mW cm^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes. . . . .	31
3.1	Estrutura química da porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me. . . . .	45
3.2	Inativação fotodinâmica de células livres de <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) com creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me [25 $\mu M$ ] com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 $mW. cm^{-2}$ (540 $J. cm^{-2}$ ). . . . .	48
3.3	Inativação fotodinâmica de células livres de <i>S. aureus</i> MSSA com creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me 1 $mM$ nas concentrações de 20 $\mu M$ , 50 $\mu M$ e 80 $\mu M$ com irradiação durante 60 min com a luz branca de intensidade de 150 $mW. cm^{-2}$ (540 $J. cm^{-2}$ ). Estes resultados correspondem a 1 ensaio para as concentrações de 20 $\mu M$ e 80 $\mu M$ , e a 2 ensaios de 50 $\mu M$ e controlos. (*) Abaixo do limite de quantificação. . . . .	49
3.4	Inativação fotodinâmica de células livres de <i>MRSA</i> com o creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me 50 $\mu M$ , com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 $mW. cm^{-2}$ (540 $J. cm^{-2}$ ). (*) Abaixo do limite de quantificação. . . . .	49
3.5	Inativação fotodinâmica de <i>E. coli</i> com o creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me 100 $\mu M$ , com irradiação durante 60 min, com a luz branca numa intensidade de 150 $mW. cm^{-2}$ (540 $J. cm^{-2}$ ). . . . .	50
3.6	Inativação fotodinâmica de <i>S. aureus</i> MSSA com a porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me, 10 $\mu M$ , com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 $mW. cm^{-2}$ (540 $J. cm^{-2}$ ). (*) Abaixo do limite de quantificação. . . . .	50



4.1	Estrutura química de fotossensibilizadores naturais e sintéticos testados nas experiências de inativação fotodinâmica de fungos. . . . .	63
4.2	Variação do raio médio das colónias de <i>L. theobromae</i> em meio de agar aveia, sob exposição à luz solar natural durante 7 dias, na presença de 1 mM de curcumina (A), 1 mM de riboflavina (B), 500 $\mu M$ de Tetra-Py <sup>+</sup> -Me (C) e 500 $\mu M$ de TBO (D). Os valores correspondem a 1 ensaio com curcumina e riboflavina e 3 ensaios independentes com Tetra-Py <sup>+</sup> -Me e TBO. . . . .	65
4.3	Exemplos do desenvolvimento das colónias de <i>L. theobromae</i> ao fim de 7 dias de incubação sob exposição a luz natural, na presença dos fotossensibilizadores TBO 500 $\mu M$ (a, b, c) e Tetra-Py <sup>+</sup> -Me 500 $\mu M$ (d, e, f). . . . .	65
4.4	Variação do raio médio das colónias de <i>B. cinerea</i> em meio de PDA, sob exposição à luz solar natural durante 7 dias, na presença de 1 mM de curcumina (A), 1 mM de riboflavina (B), 500 $\mu M$ de Tetra-Py <sup>+</sup> -Me (C) e 500 $\mu M$ de TBO (D). Os correspondem a 1 ensaio com curcumina e riboflavina e 3 ensaios independentes com Tetra-Py <sup>+</sup> -Me e TBO. . . . .	66
4.5	Exemplos do desenvolvimento das colónias de <i>Botrytis cinerea</i> ao fim de 7 dias de incubação sob exposição a luz natural, na presença dos fotossensibilizadores Tetra-Py <sup>+</sup> -Me 500 $\mu M$ (a, b, c) e TBO 500 $\mu M$ (d, e, f). . . . .	67



# Lista de Tabelas

2.1	Bactérias, fotossensibilizadores e concentrações usados nos ensaios de inativação fotodinâmica de biofilmes. . . . .	27
2.2	Bactérias, fotossensibilizadores e concentrações usados nos ensaios de inativação fotodinâmica de células planctónicas. . . . .	28
3.1	Diluições do creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me (1 <i>mM</i> ) . . . . .	47



# Abreviaturas

<b>ALA</b>	Ácido aminolevulínico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>aPDT</b>	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
<b>Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>DNase 1</b>	Desoxirribonuclease 1
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>Hp</b>	Hematoporfirina
<b>HpD</b>	Derivado de hematoporfirina
<b>LEDs</b>	”light emitted diode” Diodos emissores de luz
<b>LySMP</b>	Fagolisina
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus metilino resistentes</i>
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>PACT</b>	Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar
<b>PDI</b>	Inativação fotodinâmica
<b>PDT</b>	Terapia fotodinâmica
<b>PS</b>	Fotossensibilizador
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>SPE</b>	Substâncias poliméricas extracelulares





<b>TBO</b>	Azul de toluidina O
<b>Tetra-Py<sup>+</sup>-Me</b>	tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina
<b>TSA</b>	Tryptic Soy agar
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colónias



# Capítulo 1

## Inativação fotodinâmica

### 1.1 Terapia fotodinâmica

A aplicação terapêutica da luz é conhecida desde antiguidade havendo registros da sua aplicação no antigo Egito, Índia e China, em que se utilizavam a luz solar para tratar as doenças da pele (ex: psoríase, vitiligo e cancro) bem como o raquitismo e psicose (Spikes, 1985). O efeito fotodinâmico sobre células foi inicialmente observado por Rabb em 1900. Esta descoberta foi feita acidentalmente quando a combinação da luz e uma solução de laranja de acridina teve um efeito letal no protozoário *Paramecium caudatum* sem que houvesse qualquer efeito na ausência de luz (Rabb, 1900).

Posteriormente, Jesionek e Von Tappeiner em 1903 descobriram que é necessário oxigênio para que o efeito seja desencadeado. Tiveram bons resultados com uma solução de eosina a 5% para o tratamento de psoríase, cancro de pele e lúpus (Von Tappeiner and Jesionek, 1903).

As aplicações terapêuticas do efeito fotodinâmico foram retomadas na segunda metade do século XX. No início da década de 60 foi sintetizada uma nova droga através da purificação da hematoporfirina (Hp), designada como derivado de hematoporfirina (HpD). A eficiência deste composto foi testada sobre tumores implantados em ratos tendo sido observado que a incidência de luz proporcionava a regressão dos tumores. No final da década de 60 obteve-se sucesso no tratamento de uma mulher portadora do cancro da mama irradiando seletivamente o tumor, marcando assim o início da terapia fotodinâmica como terapia anti-tumoral (Lipson et al., 1961, 1967).

Esta abordagem foi posteriormente alargada ao tratamento de infeções microbianas e atualmente tem suscitado especial interesse no controle de estirpes resistentes (Chen et al., 2005). Neste caso, é designado como terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, *antimicrobial photodynamic therapy*) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT, *photodynamic antimicrobial chemotherapy*). Fora do contexto clínico esta abordagem é designada como inativação fotodinâmica (PDI, *photodynamic inactivation*)

## 1.2 Mecanismo de inativação

O efeito fotodinâmico baseia-se numa combinação de luz, um fotossensibilizador (PS) não tóxico, na presença de oxigénio, para gerar espécies reativas de oxigénio (ROS). Durante o processo de inativação fotodinâmica, cujo mecanismo de ação se encontra representada na Figura 1.1, o PS é irradiado/excitado com luz num comprimento de onda adequado e como consequência passa para um estado de maior energia. O PS no estado excitado pode voltar ao estado fundamental por fluorescência ou, por inversão do spin, passar para um estado excitado tripleto. No estado excitado tripleto, o PS pode interagir com o meio por dois mecanismos diferentes: no mecanismo tipo I há produção de radicais livres como seja o (superóxido  $[O_2^{\bullet-}]$ , radical hidroxilo  $[-OH^{\bullet-}]$  e peróxido de hidrogénio  $[H_2O_2]$  através das reações de transferência de eletrões entre PS excitado no estado tripleto e um substrato. No mecanismo tipo II ocorre a produção do oxigénio singleto através da transferência de energia do PS no estado tripleto para o oxigénio molecular. O oxigénio singleto é um intermediário extremamente reativo e com características eletrófilicas sendo capaz de causar danos nas membranas das células, proteínas e DNA. No entanto, apresenta um tempo de vida muito curto pelo que a sua produção deve ocorrer muito perto das células alvo (Chen et al., 2015).

Tanto o mecanismo tipo I e o mecanismo tipo II são dependentes do oxigénio e levam à formação de espécies reativas de oxigénio altamente citotóxicas. Estas por sua vez interferem com a função biológica de alguns componentes celulares tais como os ácidos gordos insaturados, as membranas, os resíduos de aminoácidos que fazem parte da estrutura proteica e as bases dos ácidos nucleicos em particular a guanina e a timina, conduzindo à morte celular (Tavares et al., 2011).

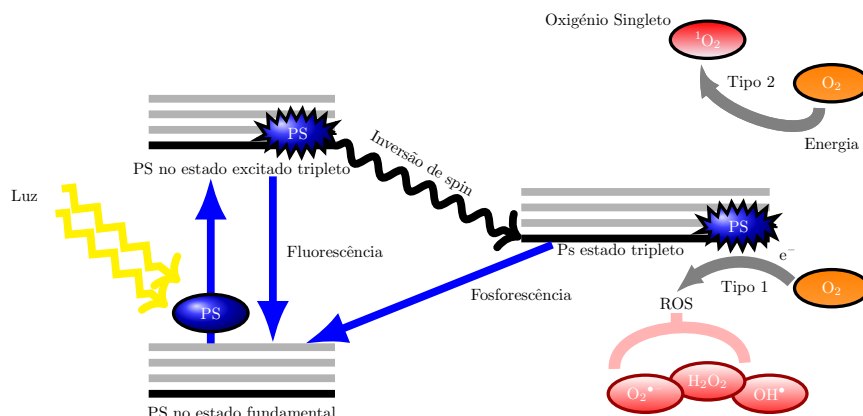


Figura 1.1: Representação esquemática dos mecanismos de inativação fotodinâmica (Calixto et al., 2016).

## 1.3 Fatores determinantes de eficiência de inativação

### 1.3.1 Microrganismos

Apesar da eficiência de terapia fotodinâmica em diferentes grupos de microrganismos, esta apresenta diferentes níveis de eficiência contra bactérias (bactérias de Gram negativo e bactérias de Gram positivo), fungos, parasitas e vírus. Sabe-se que as bactérias de Gram positivo podem ser eliminadas por vários tipos de fotossensibilizadores em concentrações mais reduzidas do que as bactérias de Gram negativo e fungos. Isso deve-se a diferenças estruturais nas paredes celulares destes microrganismos, e no caso dos fungos, devido também ao seu maior volume (Melo and Perussi, 2012). As bactérias de Gram positivo possuem uma espessa camada de peptidoglicano, que exibe um grau relativamente alto de porosidade não atuando como barreira de permeabilidade para a maioria dos PS, o que facilita a difusão do fotossensibilizador para os locais sensíveis da célula (Jori, 2006). As bactérias de Gram negativo, possuem uma membrana externa altamente organizada, composta por duas camadas lipídicas que dificulta a interação do PS com a membrana citoplasmática e impede a passagem das espécies reativas de oxigênio por ele geradas. As leveduras, por outro lado, são mais resistentes à inativação fotodinâmica, pois possuem maior tamanho celular do que as bactérias (Lazzeri et al., 2004). As espécies de *Candida*, por exemplo, são 25 a 50 vezes maiores do que as bactérias, contendo um grande número de alvos por célula para inativação fotodinâmica (Dai et al., 2009). A presença de membrana nuclear representa um outro fator que dificulta

a fotoinativação dos fungos, pois atua como uma barreira adicional na interação do material genético do microorganismo com os fotossensibilizadores (Melo and Perussi, 2012). Os principais alvos da atividade fotodinâmica são as estruturas bacterianas externas, parede celular e membrana celular, o que explica em parte as diferenças de suscetibilidade entre microrganismos. Os danos nas estruturas microbianas externas podem envolver perda do conteúdo celular ou inativação de sistemas de transporte de membrana e de enzimas. Uma adesão específica e adequada do PS a estas estruturas é considerada suficiente para a destruição da célula alvo (Tavares et al., 2010). A multiplicidade dos sítios alvos afetados durante a inativação fotodinâmica faz com que não haja o desenvolvimento de resistência dos microrganismos, fato que constitui uma das principais vantagens em relação as outras terapias convencionais. A terapia fotodinâmica possui um largo espectro de ação, visto que o fotossensibilizador pode agir sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários, independente das estirpes microbianas serem resistentes a antibióticos (Melo and Perussi, 2012).

### 1.3.2 Fotossensibilizadores

Um fotossensibilizador é uma molécula capaz de interagir com a luz e gerar espécies altamente reativas (Renno and Miller, 2001; Alenezi et al., 2016).

Os fotossensibilizadores usados na inativação microbiana podem ser compostos naturais ou sintéticos. As características essenciais de qualquer fotossensibilizador são a sua capacidade de se acumular nas células alvo, de gerar espécies citotóxicas e de induzir a morte das células. Para ser considerado um bom fotossensibilizador, este deve ser quimicamente puro, produzir oxigénio singleto ou outras espécies reativas de oxigénio (ex: superóxido, hidroxilo e radicais derivados de lípidos), ter a capacidade de se acumular no alvo celular, ser ativado por fontes de iluminação de baixo custo, não ser mutagénico, não apresentar citotoxicidade na ausência da luz, possuir um largo espectro de absorção. Deve ainda possuir natureza anfífila i.e. deve ser solúvel em água e conter grupos hidrofóbicos que facilitem a sua interação com as membranas celulares. A escolha do fotossensibilizador depende da finalidade de inativação fotodinâmica, da matriz onde os microrganismos se localizam e das fontes de luz aplicáveis (Almeida et al., 2011; Jori and Brown, 2004; Leanne B et al., 2008; Plaetzer et al., 2009; Yano et al., 2011).

Os derivados de hematoporfirina foram os primeiros fotossensibilizadores testados para

aplicação em terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Posteriormente vários outros fotossensibilizadores foram desenvolvidos. Os fotossensibilizadores (PS) naturais derivados da hematoporfirina, do tipo porfirinico Figura 1.2 constituem a primeira geração de fotossensibilizadores. Apesar do seu sucesso, estes apresentam algumas limitações, entre as quais a baixa penetração da luz nos tecidos alvos, visto que o seu máximo de absorção não ultrapassa os 630 nm. Além disso, apresentam baixo coeficiente de extinção a este comprimento de onda, o que implica administração de grandes quantidades do composto para se obter resposta terapêutica eficiente. Devido a estas limitações, houve a necessidade de desenvolver uma segunda geração de fotossensibilizadores, que inclui porfirinas sintéticas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas Figura 1.3. Estes fotossensibilizadores são compostos com propriedades farmacocinéticas e físico-químicas melhoradas, apresentando uma maior eficiência na geração de espécies reativas de oxigénio e uma maior banda de absorção em comprimentos de onda que variam dos 650-750 nm (Chen et al., 2005; Paszko et al., 2011). No entanto, são na maioria compostos são hidrofóbicos, apresentando problemas de solubilidade em meios fisiológicos. Os fotossensibilizadores de terceira geração pretendem assegurar maior seletividade para os tecidos alvo, diminuir a fotossensibilidade colateral, minimizar os efeitos secundários e obter maior absorção de luz em comprimentos de onda que penetrem mais nos tecidos infetados, estes estão associados a vários modificadores, tais como anticorpos monoclonais, nanopartículas, lipossomas e polímeros, que assegurem uma maior seletividade para as células alvo (Josefsen and Boyle, 2008; Yano et al., 2011).

Fenotiazinas, porfirinas e ftalocianinas foram testadas com sucesso na inativação fotodinâmica de bactérias de Gram positivo e outros microrganismos patogénicos. A inativação de biofilmes de bactérias de Gram positivo, Gram negativo e biofilmes mistos tem sido relatada para uma gama de fotossensibilizadores, frequentemente da família das fenotiazinas e ftalocianinas (Jori and Brown, 2004). Vários fotossensibilizadores tem sido testadas com sucesso na inativação de fungos, nomeadamente, hematoporfirinas aniónicas e seus derivados, clorinas, ftalocianinas hidrofóbicas, o corante catiónico azul de toluidina e porfirinas catiónicas (Perussi, 2007).

A inativação fotodinâmica de microrganismos em matrizes alimentares levanta questões de compatibilidade e toxicidade dos fotossensibilizadores. Os PS utilizados na inativação fotodinâmica em matrizes alimentares não devem ser tóxicos e também não devem alterar a

aparência, composição e o sabor. Vários PS derivados de fontes naturais têm sido propostos para ultrapassar este problema. Alguns desses compostos têm a vantagem de terem propriedades muito bem conhecidos e serem utilizados como aditivos autorizados em alimentos e bebidas. Curcumina, riboflavina, hipericina são exemplos de PS naturais (Luksiene and Brovko, 2013).

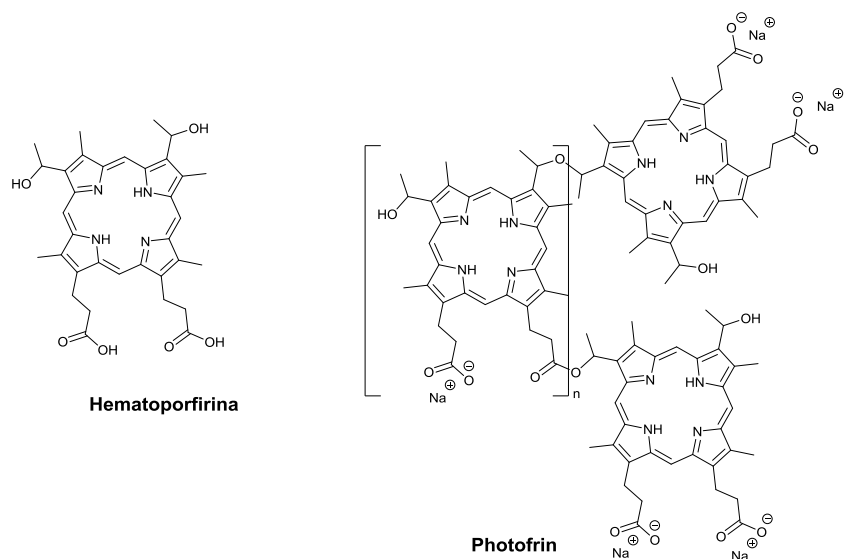


Figura 1.2: Estrutura química dos fotossensibilizadores da primeira geração.

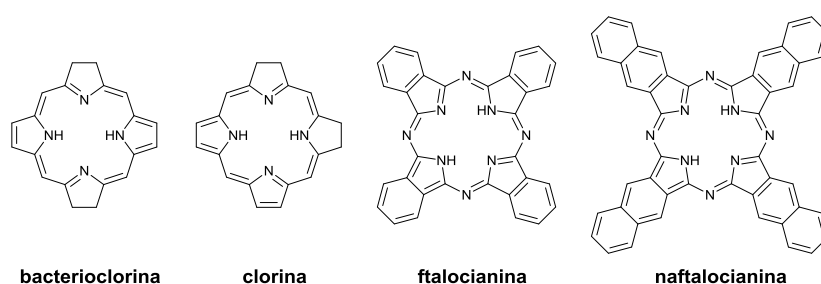


Figura 1.3: Estrutura química de fotossensibilizadores da segunda geração.

A curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) cuja estrutura química se encontra representada na Figura 1.4, é um composto polifenólico extraído do rizoma seco de *curcuma longa* e é o componente ativo do açafrão (Ammon and Wahl, 1991;



Esatbeyoglu et al., 2012). É utilizado como um corante natural, com o código de aditivo alimentar E100.

O rizoma de *curcuma longa* contém 3% a 5% de curcuminoides dos quais 50% a 60% correspondem a (curcumina demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina e curcumina cíclica) Figura 1.4 e até 5% a óleos essenciais (Esatbeyoglu et al., 2012). O teor das curcuminóides depende da sua origem e das condições do solo (Priyadarsini, 2014).

A curcumina apresenta uma vasta gama de atividades biológicas, nomeadamente atividade antimicrobiana de largo espectro contra bactérias, vírus e fungos e apresenta ainda atividades antissético, anti-inflamatória, anti-carcinogénica e anti-tóxica. A curcumina apresenta baixa ou nenhuma citotoxicidade nas células do hospedeiro sendo desta forma segura. Uma dose de 10g/dia não produz toxicidade em humanos. Trata-se de um composto praticamente insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos, solventes alcalinos e solventes extremamente ácidos. Apresenta um espectro de absorção que varia entre 408 para 430 nm (Priyadarsini, 2014).

A curcumina tem sido utilizada como um fotossensibilizador natural na inativação fotodinâmica de microrganismos, uma vez que possui um largo espectro de ação e é capaz de produzir elevados níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) quando ativada pela luz (Dovigo et al., 2013).

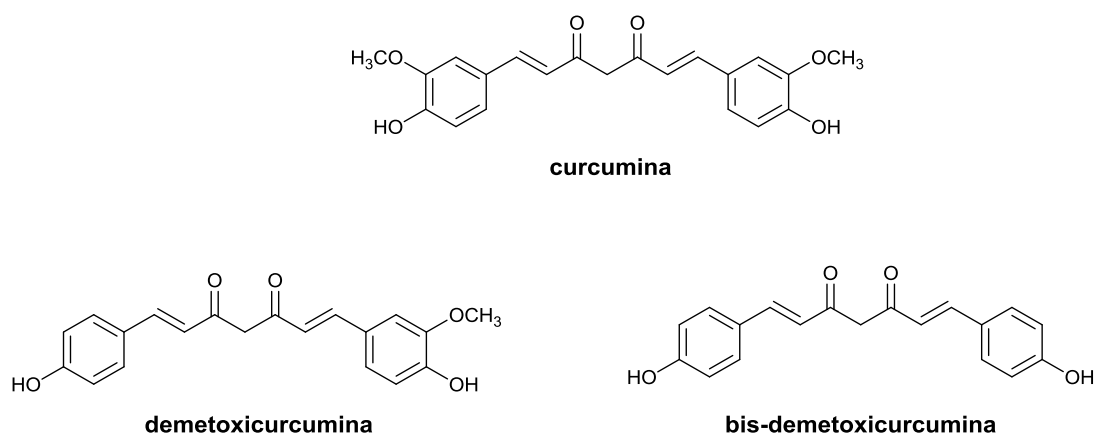
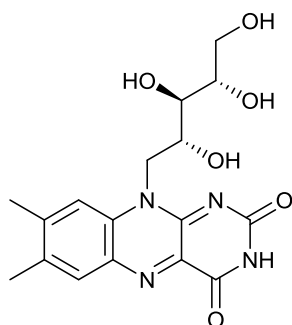


Figura 1.4: Estrutura química da curcumina e respetivos derivados.

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina) cuja estrutura química encontra-se representada na Figura 1.5 é também conhecida como vitamina B2. Possui uma estrutura planar, apresenta uma coloração amarela fluorescente. É solúvel em água, levemente solúvel em compostos orgânicos e insolúvel em compostos lipídicos. É encontrada no leite, carne, peixe e principalmente em vegetais de cor verde escura (Souza et al., 2005). É um corante amarelo-alaranjado usado como um aditivo alimentar com o código E101. Além de ser um aditivo alimentar não tóxico E101 é também um fotossensibilizador endógeno encontrada em vários alimentos e desempenha papéis essenciais na inativação dos microrganismos. Apresenta máximos de absorção na região do ultra-violeta e visível (365 nm), funcionando como um fotossensibilizador do tipo II ou interagindo com o substrato levando à foto-oxidação deste e consequentemente geração de radicais livres (mecanismos tipo I) (Souza et al., 2005; Nielsen et al., 2015; Thakuri et al., 2011). Derivados de riboflavina carregados positivamente têm sido testados com sucesso como fotossensibilizadores para a inativação de bactérias multirresistentes (Maisch et al., 2014). Estas são eficazmente inativadas sem causar danos nas células da pele (Maisch et al., 2014). A combinação da luz com os derivados da riboflavina produz também uma inativação rápida e eficaz dos endosporos *Bacillus atrophaeus* (Eichner et al., 2015). A riboflavina tem sido também testada como fotossensibilizador na desinfecção de sangue (Hubbard et al., 2015). Apesar dos vários aspetos vantajosos da utilização de riboflavina como fotossensibilizador, existem também desvantagens importantes, nomeadamente a baixa solubilidade em compostos orgânicos e a baixa afinidade por tecidos celulares. Além disso, as flavinas naturais encontram-se normalmente ligadas a proteínas e outros constituintes celulares, dificultando assim a seletividade para as estruturas celulares. Por isso, existe atualmente um grande interesse na obtenção de derivados de riboflavina com propriedades físico-químicas e de citolocalização melhoradas (Baptista et al., 2014).



**riboflavina**

Figura 1.5: Estrutura química de riboflavina.

## 1.4 Fonte de luz

A luz usada na inativação fotodinâmica deve ter um espectro de emissão adequado ao espectro de absorção PS. As fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica pertencem a três grandes grupos nomeadamente, as lâmpadas de fluorescência ou de halogéneo, díodos emissores de luz (LEDs) e os lasers. A ação destas fontes de luz depende principalmente do espectro de emissão, da fluência da luz, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho (Zelickson, 2005). Atualmente alguns estudos de inativação fotodinâmica tem sido baseados na exposição da luz solar, sobretudo quando se perspetivam aplicações ambientais (Menezes et al., 2014a).

As de halogéneo e de fluorescência abrangem quase toda a região da luz visível e o início do infravermelho. Os LEDs são constituídos por semi-condutores sólidos ligados entre si e que geram luz. Estes dispositivos fornecem luz de comprimentos de onda em regiões limitados do espectro eletromagnético e são de baixa potencia. Esta situação pode ser contornada fazendo variar o tempo de exposição à luz, isto é, irradiâncias menores podem ser compensadas por tempos de irradiação maiores. No entanto o uso de uma maior irradiância de luz num curto período de tempo e o uso de uma menor irradiância de luz num período de tempo maior pode dar resultados diferentes em termos de inativação microbiana mesmo que a dose de luz utilizado tenha sido a mesma (Wainwright, 1998).

Os lasers além de fornecerem um feixe de luz homogéneo emitem também luz num comprimento de onda específico que pode ser compatível com o espectro de absorção do agente

fotossensibilizador. Estes emitem uma alta fluência de luz monocromática correspondendo deste modo ao pico de absorção do agente fotossensibilizante, permitindo deste modo a realização de uma terapia fotodinâmica mais rápida. Porém estes aparelhos são extremamente caros, nem sempre são portáteis e necessitam de mais assistência técnica (Torezan et al., 2009). A luz solar é uma luz policromática cujo espectro os picos de absorção dos agentes fotossensibilizantes até agora conhecidos (Silva and Martins, 1996). Trata-se de uma fonte de luz natural e de baixo custo. Apresenta porém a desvantagem de só ser aplicável durante o dia.

## 1.5 Vantagens e limitações de terapia fotodinâmica

A aplicação do efeito fotodinâmico na inativação é um processo multi-alvo contra bactérias, fungos, vírus e parasitas, que reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (Bastos et al., 2012). Apesar de apresentar um amplo espectro de ação contra microrganismos, estes apresentam diferentes suscetibilidades devido às diferenças nas estruturas celulares externas (parede celular e membrana celular). A presença de uma bicamada lipídica na parede das bactérias de Gram negativo confere-lhes um baixo grau de permeabilidade para os fotossensibilizadores (PS) mais comumente utilizados. A parede celular das leveduras como por exemplo a *Candida spp.* apresentam uma permeabilidade intermédia entre as bactérias de Gram negativo e bactérias de Gram positivo (Sperandio et al., 2013). Os PS (porfirinas ou ftalocianinas) aniônicos ou neutros podem ser eficazes contra bactérias de Gram positivo, mas normalmente não inativam bactérias de Gram negativo (Sperandio et al., 2013). Com o intuito de ultrapassar esta dificuldade e melhorar a penetração dos PS em bactérias de Gram negativo, têm sido testados pré-tratamentos com diferentes agentes químicos tais como, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pois sabe-se que as células pré-tratadas com EDTA perdem até 50% do seu lipopolissacarídeo, tornando-se deste modo sensíveis aos agentes hidrofóbicos (Sperandio et al., 2013). Os PS catiónicos podem ser eficazes na inativação de bactérias de Gram negativo sem necessidade dos agentes químicos permeabilizantes. A carga positiva promove uma forte interação electroestática com os locais carregados negativamente da superfície externa das bactérias Gram de negativo, aumentando deste modo a eficácia da inativação fotodinâmica (Camino et al., 2008). Outras limitações baseia no fato dos PS apresentarem cor, pelo que não podem ser usados em todo tipo de

materiais. Outra limitação baseia-se no fato de tratar de ser uma terapia aplicável apenas em lesões superficiais ou tecidos acessíveis a luz. Outra limitação baseia-se na baixa fotostabilidade dos fotossensibilizadores para aplicações ambientais com irradiação prolongada (Albini and Fasani, 1998; Yogo et al., 2005).

## 1.6 Objetivo geral

A inativação fotodinâmica tem sido testado com sucesso como estratégia alternativa de inativação de microrganismos e biofilmes microbianos na perspectiva de ultrapassar o problema de resistência a agentes antimicrobianos. No entanto, a sua aplicação é ainda limitada por constrangimentos relacionados com o tipo de microrganismos a inativar e com a sua resistência intrínseca, particularmente quando se trata de biofilmes microbianas, que constituem a forma com que os microrganismos mais frequentemente apresentam.

Este trabalho teve como objetivo geral testar a aplicabilidade de inativação fotodinâmica a contextos particulares. Assim foram abordados três contextos de aplicação diferentes: (a) a inativação de biofilmes de patógenos alimentares, (b) a imobilização de fotossensibilizadores em matrizes semi-sólidos para inativação de patógenos de pele, (c) a inativação de fungos fitopatogénicos.

## 1.7 Bibliografia

- Albini, A. and Fasani, E. (1998). *Drugs, Photochemistry and Photostability*, volume 225. Royal Society of Chemistry.
- Alenezi, K., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., and Benov, L. T. (2016). , 1-22.
- Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M., Tom, A., and Neves, M. (2011). Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and Environmental Applications.
- Ammon, H. P. and Wahl, M. A. (1991). Pharmacology of curcuma longa. *Planta Medica*, 57(01):1-7.
- Baptista, A., Melo, L., Kato, I., Nunez, S., de Araujo, R., Ribeiro, M., et al. (2014). Efeito fotodinâmico da riboflavina associada a nanopartículas de prata em *Streptococcus mutans*.
- Bastos, M. M., Boechat, N., Gomes, A. T., Neves, M. G., and Cavaleiro, J. A. (2012). O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. *Revista Virtual de Química*, 4(3):257-267.
- Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., de Freitas, L. M., Fontana, C. R., and Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*, 21(3):342.
- Caminos, D. A., Spesia, M. B., Pons, P., and Durantini, E. N. (2008). Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5, 10, 15, 20-tetra (4-n, n, n-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photochemical Photobiological Sciences*, 7(9):1071-1078.
- Chen, B., Pogue, B. W., and Hasan, T. (2005). Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(3):477-487.
- Chen, C.-P., Hsieh, C.-M., Tsai, T., Yang, J.-C., and Chen, C.-T. (2015). Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue o for antimicrobial photodynamic inactivation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9):20859-20872.
- Dai, T., Huang, Y.-Y., and Hamblin, M. R. (2009). Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6(3):170-188.
- Dovigo, L. N., Carmello, J. C., de Souza Costa, C. A., Vergani, C. E., Brunetti, I. L., Bagnato, V. S., and Pavarina, A. C. (2013). Curcumin-mediated photodynamic inactivation of

- Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Medical Mycology*, 51(3):243-251.
- Eichner, A., Gollmer, A., Spath, A., Baumler, W., Regensburger, J., Konig, B., and Maisch, T. (2015). Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using lightactivated derivatives of vitamin b2. *Photochemical Photobiological Sciences*, 14(2):387-396.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E., and Rimbach, G. (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22):5308-5332.
- Hubbard, T., Backholer, L., Wiltshire, M., Cardigan, R., and Ariens, R. A. (2015). Effects of riboflavin and amotosalen photoactivation systems for pathogen inactivation of fresh-frozen plasma on fibrin clot structure. *Transfusion*, 56(1):41-48.
- Jori, G. (2006). Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1-2).
- Jori, G. and Brown, S. B. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical Photobiological Sciences*, 3(5):403-405.
- Josefsen, L. and Boyle, R. (2008). Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology*, 154(1):1-3.
- Lazzeri, D., Rovera, M., Pascual, L., and Durantini, E. N. (2004). Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochemistry and Photobiology*, 80(2):286-293.
- Leanne B, J., Ross W, B., et al. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs*, 2008.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J., and Gray, M. J. (1967). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, 20(12):2255-2257.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J., and Olsen, A. M. (1961). The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection 23.
- Luksiene, Z. and Brovko, L. (2013). Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Engineering Reviews*, 5(4):185-199.
- Maisch, T., Eichner, A., Spath, A., Gollmer, A., Konig, B., Regensburger, J., and Baumler, W. (2014). Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PloS One*, 9(12):e111792.
- Melo, W. C. M. A. and Perussi, J. R. (2012). Comparando inativação fotodinâmica e anti-

microbianos. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 33(3):331-340.

Menezes, H. D., Pereira, A. C., Brancini, G. T., de Leão, H. C., Júnior, N. S. M., Bachmann, L., Wainwright, M., Bastos, J. K., and Braga, G. U. (2014). Furocoumarins and coumarins photoinactivate *colletotrichum acutatum* and *aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 131:74-83.

Nielsen, H. K., Garcia, J., Vaeth, M., and Schlafer, S. (2015). Comparison of riboflavin and toluidine blue o as photosensitizers for photoactivated disinfection on endodontic and periodontal pathogens in vitro. *PloS One*, 10(10):e0140720.

Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., and Reynolds, J. V. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(1):14-29.

Perussi, J. R. (2007). Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 30(4):988.

Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., and Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, 24(2):259-268.

Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12):20091-20112.

Rabb, O. (1900). Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoren. *Zeitschrift für Biologie*, 39:524-526.

Renno, R. Z. and Miller, J. W. (2001). Photosensitizer delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52(1):63-78.

Silva, C. C. and Martins, R. d. A. (1996). A teoria sobre luz e cores” de isaac newton: uma tradução comentada. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 18(4):313-27.

Souza, A. C. S., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., Cavagis, A. D. M., and Peppelenbosch, M. P. (2005). Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*, 28(5):887.

Sperandio, F., Huang, Y.-Y., and Hamblin, M. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 8(2):108-120.

Spikes, J. D. (1985). The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In *Primary photo-processes in biology and medicine*, pages 209-227. Springer.



- Tavares, A., Carvalho, C., Faustino, M. A., Neves, M. G., Tomé, J. P., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Gomes, N., Alves, E., et al. (2010). Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Marine Drugs*, 8(1):91-105.
- Tavares, A., Dias, S. R., Carvalho, C. M., Faustino, M. A., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Gomes, N. C., et al. (2011). Mechanisms of photodynamic inactivation of a gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochemical Photobiological Sciences*, 10(10):1659-1669.
- Thakuri, P., Joshi, R., Basnet, S., Pandey, S., Taulale, S., and Mishra, N. (2011). Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. *Nepal Medical College Journal*, 13(4):281-284.
- Torezan, L., Niwa, A. B. M., FESTA NETO, C., et al. (2009). Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84(5):445-459.
- Von Tappeiner, H. and Jesionek, A. (1903). Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munch Med Wochenschr*, 47:2042-2044.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (pact). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1):13-28.
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S.-i., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., and Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1):46-67.
- Yogo, T., Urano, Y., Ishitsuka, Y., Maniwa, F., and Nagano, T. (2005). Highly efficient and photostable photosensitizer based on bodipy chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 127(35):12162-12163.
- Zelickson, B. D. (2005). Mechanisms of action of topical aminolevulinic acid. *Photodynamic Therapy*. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pages 1-12.
- Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., and Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed research international*, 2014:1-13.



## Capítulo 2

# Inativação fotodinâmica de biofilmes alimentares com fotossensibilizadores naturais e sintéticos

### Resumo

Os biofilmes microbianos são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as formas planctônicas correspondentes. Assim o desenvolvimento de biofilmes em superfícies relacionadas com processamento ou acondicionamento de alimentos é uma preocupação global em termos de segurança alimentar visto que podem sobreviver aos processos de sanitização e representar uma fonte de contaminação e deterioração. A fim de controlar o desenvolvimento de biofilmes e contornar a sua resistência a detergentes e biocidas químicos, pretendeu-se avaliar a eficiência de fotossensibilizadores naturais na inativação fotodinâmica de biofilmes relevantes em contexto de segurança alimentar. Como fotossensibilizador (PS) natural testou-se a curcumina e como PS sintéticos foi usada uma porfirina tetracatiônica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me). Como patogénicos alimentares formadores de biofilmes, foram testadas as bactérias *Listeria innocua*, usada como modelo da espécie patogénica *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Com a concentração de 200  $\mu M$  de curcumina e uma dose de luz azul de 270  $J.cm^{-2}$  obteve-se uma redução de 3,4 *Log* na concentração de células viáveis em biofilmes de *L. in-*

*nocua*. Com 100  $\mu M$  de curcumina a redução da concentração de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* foi de 0,6 Log. Nas formas planctónicas correspondentes, as reduções foram de 8,3 Log e 3,2 Log, respetivamente usando a curcumina numa concentração de 100  $\mu M$  e uma dose de luz azul de 270  $J.cm^{-2}$ . Com uma concentração de 10  $\mu M$  de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e uma dose de luz branca de 270  $J.cm^{-2}$  obteve-se uma redução de 1,6 Log na concentração de células viáveis em biofilmes de *L. innocua*. Com 5.0  $\mu M$  de porfirina obteve-se uma redução de 2,1 Log em biofilmes de *S. aureus*. Nas formas planctónicas, as reduções foram de 8,7 Log e 6,0 Log para as células planctónicas de *L. innocua* e *S. aureus* com de 1.0  $\mu M$  e 5.0  $\mu M$  de PS respetivamente.

A curcumina foi mais eficiente na inativação dos biofilmes de *L. innocua* do que a porfirina tetracatiónica. No entanto, em *S. aureus* verificou-se um padrão claramente inverso. A inativação fotodinâmica pode ser eficaz na inativação de biofilmes de patogénicos alimentar. No entanto, a escolha do fotossensibilizador depende da natureza do patogénico que se pretende inativar e da biocompatibilidade do fotossensibilizador com a matriz alimentar.

**Palavras chave:** *Biofilmes bacterianos, alimentos, curcumina, inativação fotodinâmica*

## 2.1 Biofilmes microbianos

A maioria das bactérias encontradas em ambientes naturais ou hospitalar são encontradas em associação com superfícies sob forma de agregados multicelulares denominados de biofilmes (Tonon et al., 2015; Giaouris et al., 2015).

Um biofilme microbiano consiste num conjunto de microrganismos de uma única espécie ou de espécies diferentes, que pode incluir, bactérias, fungos e microalgas incorporados numa matriz polimérica auto-produzida e que se fixam a uma superfície sólida ou se concentram numa interface (Taraszkiewicz et al., 2012). Esta matriz auto-produzida desempenha um papel importante, pois fornece aos biofilmes uma maior estabilidade estrutural e proteção contra condições ambientais adversas e é constituída por diferentes tipos de biopolímeros, globalmente designadas por substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Estes consistem numa mistura complexa de macromoléculas, como proteínas, polissacarídeos, lípidos e ácidos nucleicos. Porém a sua composição varia de acordo com as espécies microbianas, com o estado

fisiológico e com as condições ambientais (Flemming et al., 2007; Flemming and Wingender, 2010; Beech et al., 2010). As SPE funcionam como uma barreira defensiva, protegendo as células de serem arrastadas pelo fluxo de fluido e ajudando a célula a resistir as condições de stress múltiplo, tais como a diminuição de nutrientes e água, a presença de biocidas e outras formas de stress ambiental (Menoita et al.).

A biomassa representa menos de 10% da massa do biofilme, enquanto que a matriz extracelular representa mais de 90% da massa seca. Os biofilmes são constituídos essencialmente por água, que representa 70% a 95% da massa total. Segundo alguns autores a razão massa da água/massa do biofilme pode ser próxima de 99% (Azeredo and Oliveira, 2000).

Em virtude do efeito protetor da matriz extracelular e das alterações fenotípicas induzidas na comunidade por processos de comunicação celular (quorum sensing) os biofilmes são intrinsicamente menos suscetíveis a agentes antimicrobianos do que as formas planctónicas das mesmas espécies (Høiby et al., 2010). Particularmente em relação aos antibióticos, os mecanismos de resistência convencionais, tais como bombas de efluxo, enzimas modificadoras e mutações no alvo não são suficientes para explicar a resistência antimicrobiana, embora contribuam para a redução da suscetibilidade microbiana em biofilmes (Stewart, 2002).

Vários outros fatores têm sido associados à resistência de biofilmes a compostos antimicrobianos: a) baixas taxas de atividade metabólica e de crescimento das bactérias em biofilmes, principalmente daquelas que se encontram nas camadas mais internas; b) presença da matriz polimérica extracelular que atua como uma barreira física à penetração de compostos antimicrobianos, podendo também interagir quimicamente com esses agentes, sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos; c) transferência de genes de resistência, visto que a proximidade entre células microbianas facilita a transferência horizontal de genes, que conferem resistência para múltiplos agentes antimicrobianos; d) falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunitária humana; e) co-existência de diferentes espécies com diferentes graus de suscetibilidade (Silva Trentin et al., 2013; Oliveira et al., 2010).

Os biofilmes assumem relevância no contexto de segurança alimentar, visto que estes podem formar-se nos alimentos e nos utensílios e superfícies de preparação (Djordjevic et al., 2002). *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella* e *Campylobacter* são alguns dos patogénicos alimentares mais relevantes em termos de incidência ou de severidade das doenças por eles causadas (Team et al., 2013).

A formação dos biofilmes microbianos nas indústrias alimentares ocorre devido a falhas nos procedimentos de higienização e à emergência de bactérias resistentes aos processos convencionais de sanitização. As superfícies e o ambiente onde os alimentos são processados constituem importantes fatores que determinam o risco de formação dos biofilmes. Estes podem acumular-se numa grande variedade de substratos nomeadamente, vidro, borracha, aço inox, teflon e polipropileno (Oliveira et al., 2010).

A presença dos biofilmes microbianos nas indústrias alimentares representam uma potencial fonte de contaminação e aumentam o risco de doenças associadas, nomeadamente intoxicações alimentares ou toxico-infeções (Araújo et al., 2010; Ribeiro, 2011).

Os biofilmes microbianos representam agregados com elevada densidade microbiana e o desprendimento das porções aderidas podem levar à contaminação e deterioração dos alimentos. Dessa forma podem prejudicar a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros em virtude da diminuição da vida de prateleira. Os alimentos deteriorados apresentam alterações no aspeto, sabor e odor devido a produção de compostos voláteis efetuados pelos microrganismos. Os microrganismos produzem enzimas sacrolíticas, proteolíticas, pectinolíticas e lipolíticas cujos produtos metabólicos finais estão associados com a deterioração dos alimentos e ao aparecimento de sabores desagradáveis (Ragaert et al., 2007). Os biofilmes microbianos nas indústrias alimentares também podem desencadear processos corrosivos uma vez que catalisam reações químicas e biológicas que causam biocorrosão microbiologicamente influenciada (MIC-microbial induce corrosion), particularmente relevante na corrosão de metais (Araújo et al., 2010). Comportam-se também como camadas isolantes dificultando a transferência de calor entre as superfícies diminuindo assim a vida útil dos equipamentos e como consequência, aumentando os custos de manutenção e substituição de peças dos equipamentos e a eficiência dos processos industriais (Araújo et al., 2010).

A prevenção de formação de biofilme e a inativação de biofilmes instalados são estratégias de redução do risco de contaminação cruzada dentro do ambiente de processamento de alimentos e do produto alimentar (Schlisselberg and Yaron, 2013). O método mais eficaz para a remoção de biofilme deve inativar e/ou matar os microrganismos bem como destruir a matriz polimérica extracelular, visto que alguns dos constituintes de matriz funcionam como sinais químicos que vão atrair novas células por quimiotactismo (Simões et al., 2010). Os métodos de erradicação ou prevenção da formação dos biofilmes podem ser classificados como métodos

químicos, físicos e biológicos (Peres et al., 2008; Sadekuzzaman et al., 2015). Os métodos químicos tais como o uso de cloro, peróxidos e ácidos geralmente são os mais utilizados em ambientes de processamento alimentar. A limpeza do local com desinfetantes é um método comum para a prevenção e remoção da contaminação, sendo que os agentes de limpeza alcalinos são considerados os mais eficazes principalmente contra bactérias de Gram positivo. Alguns compostos produzidos por plantas e outros compostos naturais também tem sido testados com sucesso na inativação de biofilmes. É o caso do mel e certos óleos essenciais (Sadekuzzaman et al., 2015). O extrato de *Capparis spinosa* na concentração de 2 mg/mL, inibe a formação de biofilme e a produção de SPE em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Prteus mirabilis* (Abraham et al., 2011). A maioria do OEs exercem efeito antimicrobiano com reduzida probabilidade de desenvolvimento de resistência (Ohno et al., 2003; Ali et al., 2005). O óleo de canela é um OE amplamente utilizado na indústria de alimentos por causa do seu aroma especial (Chang et al., 2001). Há evidências que o óleo de canela é eficaz contra biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus plantarum* (Filoche et al., 2005). Estudos realizados demonstraram que tanto as formas planctônicas *S. epidermidis* assim como os biofilmes são suscetíveis ao óleo de canela derivado de casca de "*Cinnamomum burmannii*" (Nuryastuti et al., 2009).

Os bacteriófagos atualmente são considerados um potencial alternativa biológica para inibição de biofilmes. Os fagos são altamente específicos contra um hospedeiro ou gama de hospedeiros e, portanto, não afetam a microflora normal de matriz onde são aplicados. O fago pode penetrar a matriz EPS via difusão ou com a ajuda de enzimas codificadas pelos fagos (Donlan, 2009). A fagolisina LySMP revelou-se especialmente eficaz na inativação de biofilmes de *Streptococcus suis*. Além do rompimento da estrutura do biofilme, as células de *S. suis* foram posteriormente inativadas por LySMP (Meng et al., 2011).

O pré-acondicionamento das superfícies com biosurfactantes nomeadamente, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* e ramnolipidos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, constituem uma outra estratégia de retardar a inalação de biofilmes microbianos (Sadekuzzaman et al., 2015). Os biosurfactantes são compostos tensoativos de origem microbiana que apresentam baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade e são utilizados nas indústrias alimentares como emulsionantes e estabilizadores (Banat et al., 2010). Num estudo realizado com biofilmes monoespecíficos ou mistos dos patogénicos de origem alimentar *S. aureus*, *L.*

*monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, verificou-se que o pré-acondicionamento da superfície polistireno com surfactina numa concentração de 0,25%, reduziu 42% da adesão de *L. monocytogenes* e *S. enteritidis* e o pré-acondicionamento da superfície com ramnolipidos (1%) causou uma redução de 57,8% e 67,8% na formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e de *S. aureus*, respetivamente. Os ramnolipidos na concentração de 0,25% causaram reduções de 58,5%, 26,5%, 23,0% e 24,0% em biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e da cultura mista, respetivamente.

Estudos recentes revelaram que a destruição da arquitetura do biofilme pode ser alcançada por várias enzimas que desempenham um papel essencial na dispersão do biofilme maduro (Kaplan, 2010). DNase 1 aplicada na concentração de 5,0  $\mu\text{g/mL}$  causa 40% de redução da biomassa de biofilmes de *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Verifica-se ainda um efeito sinérgico entre a enzima e o efeito de antibiótico, azitromicina, rifampicina, levofloxacina, ampicilina e cefotaxima aplicados conjuntamente com a enzima reduziram significativamente a biomassa dos biofilmes (Tetz et al., 2009).

A inativação fotodinâmica está já demonstrada como uma alternativa eficaz para inativação de biofilmes microbianos (Beirão et al., 2014). No entanto, tal como acontece relativamente a outras estratégias de inativação, a inativação fotodinâmica dos biofilmes microbianos é também menos eficiente em biofilmes do que nas formas planctónicas correspondentes (Beirão et al., 2014). Assim, a inativação fotodinâmica de biofilmes requer concentração de fotossensibilizador mais elevadas e maiores doses de luz, visto que a eficácia de inativação pode ser reduzida, pela diminuição de penetração do fotossensibilizador, pela dificuldade de propagação de luz nas células e pelo efeito de captura das espécies reativas de oxigénio pelos constituintes de matriz extra celular (Beirão et al., 2014). No entanto, conseguem-se fatores de inativação de biofilmes bacterianos frequentemente melhores do que com as abordagens convencionais. Pereira et al, avaliaram os efeitos específicos de inativação fotodinâmica de biofilmes de *Candida albicans*, *S. aureus* e *Streptococcus mutans* com o fotossensibilizador azul de metileno. Foram observadas reduções significativas na viabilidade dos microrganismos e a redução foi maior nos biofilmes formados por uma única espécie (2,32 – 3,29 Log) do que nos biofilmes mistos (1,00 – 2,44 Log). Micrografias de microscopia eletrónica de varrimento sugerem que a fotossensibilização letal ocorre predominantemente nas camadas ul-



traperiféricas do biofilme (Pereira et al., 2011). Os resultados mostraram que o PDI mediada pelo corante azul de metileno, pode ser uma abordagem útil para o controle do biofilme oral (Pereira et al., 2011). *Beirão et al., 2014* avaliaram a eficácia da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e de *Candida albicans*, bem como em biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans*. Os resultados revelaram que a porfirina tetracatiônica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) é eficaz na inativação de biofilmes e em células livres, sendo que o efeito de inativação foi atenuado em biofilmes, em relação a células-livres. Os microrganismos testados foram expostas a uma dose de 64,8 J.cm<sup>-2</sup>, por exposição a luz de intensidade 40 W.m<sup>-2</sup>, durante 270 minutos, obteve-se uma inativação completa de *S. aureus* (7,4 Log) logo após os 60 min de irradiação (14,4 J.cm<sup>-2</sup>) com 5.0 μM do PS. Em relação aos biofilmes de *S. aureus*, 10 μM Tetra-Py<sup>+</sup>-Me provocaram uma diminuição de 5.0 Log do número de células viáveis ao fim de 270 min (Beirão et al., 2014). Uma vez que nas indústrias alimentares não se pode usar compostos que não são compatíveis com os alimentos, usam-se então fotossensibilizadores naturais como por exemplo a curcumina e a riboflavina. *Tortik et al., 2014* avaliaram o efeito de curcumina na descontaminação de carne de frango inoculada com *S. aureus*. A carne de frango foi polvilhada com curcumina na concentração de 100 μM e foi irradiada com luz visível 435 nm (33,8 J.cm<sup>2</sup>). Houve uma redução de 1,7 Log (98%) da concentração de células viáveis de *S. aureus* em comparação com os controles sem nenhuma alteração visível da aparência exterior do género alimentício após a descontaminação fotodinâmica (Tortik et al., 2014).

Considerando os resultados promissores de inativação de patógenos com curcumina reportada na literatura, o objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de inativação de biofilmes microbianos com este fotossensibilizador natural compará-lo, em termos de aplicabilidade, com um fotossensibilizador de referência (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me). Como modelos biológicos representativos de patógenos alimentares foram testadas as bactérias *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus*.

## 2.2 Materiais e métodos

### 2.2.1 Microrganismos e condições de crescimento

Para as experiências de inativação de biofilmes microbianos foram usadas duas bactérias de Gram de positivo nomeadamente: *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213. A estirpe de *S. aureus* ATCC® 29213 foi cedida pela coleção de culturas para as aulas do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. A estirpe de *Listeria innocua* foi cedida pela coleção de culturas da Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa.

*Listeria innocua* é uma espécie de bactéria de Gram de positivo, com forma de bacilo, são anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos. É considerada uma saprófita não-hemofílica, com uma grande distribuição no ambiente e capaz de sobreviver a condições extremas (pH elevado, temperaturas altas e baixas e elevadas concentrações de sal), ocorrendo em solo, águas superficiais, vegetais em deterioração, esgotos e produtos alimentares (Moreno et al., 2012). A sequência completa do genoma desta espécie mostra a sua relação próxima com *L. monocytogenes* sendo frequentemente usada como modelo desta última em testes de suscetibilidade a agentes antimicrobianos (Buchrieser et al., 2003; Milillo et al., 2012). A *L. monocytogenes* é frequentemente encontrada em locais refrigerados e têm a capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes, sendo uma ameaça para as indústrias alimentares (Carpentier and Cerf; Van Houdt and Michiels, 2010). No entanto *Listeria innocua* não é patogénica (Milillo et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria de Gram positivo anaeróbia facultativa, imóvel que não apresenta cápsula ou tem uma cápsula limitada (Correal et al., 2013). É encontrada no ambiente e faz parte da microbiota normal humana (Gelatti et al., 2009). Como patogénico alimentar, é a causa frequente de intoxicações alimentares, que ocorrem após a ingestão de enterotoxinas (Bianchi et al., 2014). Os alimentos normalmente envolvidos nos surtos alimentares causados por *S. aureus* incluem os queijo (20%), seguido de refeições mistas ou "buffet" (15,9%), carne de frango e seus produtos (8,6%), carne de suíno e seus produtos (5,7%) (Team et al., 2013).

A estirpe de *L. innocua* usada neste trabalho encontrava-se armazenada no congelador à -80 °C com 20% de glicerol. O processo de reativação foi iniciado por cultivo do congelado

em meio de *Tryptic Soy Broth* (TSB, Liophilchem) e incubação à temperatura de 37 °C, com agitação a 130 rpm, durante 24h. Após a primeira incubação, retirou-se 500  $\mu$ L da suspensão bacteriana para um frasco com 50 mL de TSB. A nova cultura foi incubada nas mesmas condições. Após a segunda incubação foi feita uma repicagem para meio *Tryptic Soy Agar* (TSA, Liophilchem), a fim de se obter colónias isoladas. As culturas em meio sólido foram conservadas no frio (4 °C) como culturas-stock e renovadas periodicamente (aproximadamente de 2 em 2 semanas).

Antes de cada ensaio, foram preparadas culturas frescas a partir das culturas-stock armazenadas e conservadas no frio 4 °C. As bactérias foram repicadas duas vezes para meio TSB e incubadas à temperatura de 37 °C com agitação de 130 rpm. A primeira repicagem foi realizada a partir da inoculação de uma colónia isolada, da placa de TSA, para um frasco contendo 50 mL de TSB. Ao fim de 24h, retirou-se 500  $\mu$ L da cultura e inoculou-se um novo frasco contendo 50 mL de TSB. Esta cultura também foi incubada à 37 °C com agitação de 130 rpm. Antes da realização dos ensaios, avaliou-se o crescimento das culturas de trabalho por medição da ( $D.O_{600} \approx 0,8$ ).

### 2.2.2 Preparação dos biofilmes bacterianos

Para a preparação dos biofilmes, distribuiu-se alíquotas de 1 mL de suspensão bacteriana em microtubos de polipropileno de 2 mL. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas sem agitação, correspondendo a fase de adesão das células livres às paredes do microtubo. Ao fim das 24h removeu-se o meio líquido e lavou-se suavemente o biofilme com 1 mL do tampão fosfato salino [PBS 3,2 g NaCl (*Sigma-Aldrich*), 0,08 g KCl (*Sigma-Aldrich*), 0,576 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*AppliChem*) e 0,096 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*AppliChem*) para 400 mL] a fim de remover as células não-aderentes. Depois da lavagem adicionou-se a cada microtubo 1 mL de TSB e prosseguiu-se com a incubação dos biofilmes a 37 °C durante 48 h, para permitir o seu desenvolvimento (maturação).

### 2.2.3 Fotossensibilizadores

Para os ensaios de inativação fotodinâmica utilizou-se um fotossensibilizador natural, a curcumina, e uma porfirina tetracatiónica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) como fotossensibilizador de referência cujas estruturas química se encontram representadas na Figura 2.1. A solução-stock

de 500  $\mu M$  da porfirina foi preparada em dimetil sulfóxido (DMSO). Esta porfirina foi sintetizada pelo grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. A curcumina é um composto autorizado como aditivo alimentar, da categoria dos intensificadores de cor (E100) (Esatbeyoglu et al., 2012). A solução-stock de curcumina (1 mM) foi preparada a partir da curcumina comercial (*Alfa Aesar*) em acetona. Os frascos com as soluções-stock foram cobertos com folha de alumínio de modo a evitar a fotodegradação. A solução-stock de curcumina foi armazenada no frigorífico a 4 °C de modo a evitar a evaporação de acetona. Antes de cada ensaio, as soluções-stock foram sonificadas (*Silvercrest*) durante 30 minutos a fim de desagregar as partículas eventualmente formadas durante o armazenamento.

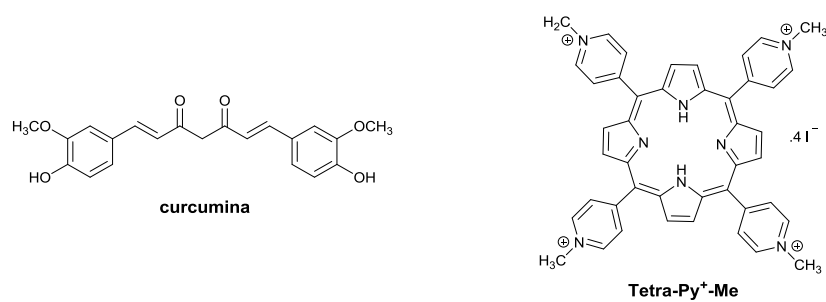


Figura 2.1: Estrutura química da curcumina e da porfirina tetracatiónica.

## 2.2.4 Condições de irradiação e controlos

Para a irradiação das amostras durante os ensaios de inativação fotodinâmica foi utilizado um sistema de iluminação artificial lumacare equipada com uma fibra ótica de luz azul (300 – 400 nm) ou uma fibra ótica luz branca (400 – 700 nm) para curcumina ou porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, respetivamente. Os biofilmes microbianos, bem como as células planctónicas, foram irradiados a mesma intensidade de luz (150 mW.cm<sup>-2</sup>) durante 30 min correspondendo, a uma dose de total de energia de 270 J.cm<sup>-2</sup>.

Em cada ensaio foram incluídos dois controlos. Os controlos claros foram preparados da mesma forma que os testes, mas sem adição de fotossensibilizador. Os controlos escuros foram preparados da mesma forma que os testes, mas foram mantidos ao abrigo da luz, protegidos com folha de alumínio, durante o tempo de experiência.

### 2.2.5 Inativação fotodinâmica de biofilmes

Após o período de maturação dos biofilmes, o meio líquido que se encontravam nos microtubos foi removido e os biofilmes foram suavemente lavados com 1 *mL* de PBS para remoção de células livres. A cada microtubo adicionou-se PBS e um volume conveniente de solução de PS de modo a atingir a concentração de trabalho num volume final de 1 *mL*. As concentrações de fotossensibilizador usadas em cada tipo de biofilme encontram-se sumariadas na tabela 2.1. Após a preparação dos testes (PS + PBS + Luz), controlos claros (PBS + Luz) e os controlos escuros (PS + PBS), procedeu-se a uma pré-incubação de 30 minutos no escuro a 37 °C, para permitir a adsorção do fotossensibilizador às células. Após este período, procedeu-se à irradiação dos testes e dos controlos claros. Para cada um dos ensaios realizados foram testados quatro tempos de irradiação (T0, T10, T20, T30). Em cada tempo foram recolhidas 3 microtubos de cada tratamento experimental (réplicas). A inativação do biofilme foi avaliada pela variação de concentração de células viáveis, determinada por sementeira em meio sólido. Os microtubos foram sonicados durante 90 seg para dispersão das células aderentes à superfície interior do microtubo e homogeneizados no vórtex durante 1 minuto. Procedeu-se à diluição decimal das amostras em PBS e semeou-se por incorporação em TSA duas réplicas das diluições adequadas. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 24h e procedeu-se à contagem de colónias nas diluições mais convenientes. O teor de células viáveis nas suspensões obtidas a partir dos biofilmes foi calculado a partir de média das contagens de colónias nas réplicas, corrigida para o fator de diluição. O fator de inativação para cada condição experimental foi calculado como a diferença entre o logaritmo de concentração inicial de células viáveis e a concentração no final da irradiação. Para cada condição experimental foram realizadas 3 ensaios independentes, salvo indicado na secção de resultados.

Tabela 2.1: Bactérias, fotossensibilizadores e concentrações usados nos ensaios de inativação fotodinâmica de biofilmes.

Bactéria	Curcumina	Tetra-Py <sup>+</sup> -Me
<i>L. innocua</i>	200 $\mu M$	10 $\mu M$
		20 $\mu M$
<i>S. aureus</i>	100 $\mu M$	5 $\mu M$

### 2.2.6 Inativação fotodinâmica de células planctónicas

A partir das culturas frescas em TSB, foram preparadas diluições 1:10 em PBS. Aliquotas de 10 mL de suspensão de células foram distribuídas em goblés aos quais se adicionou o volume de solução-stock de fotossensibilizador necessário para obter as concentrações de trabalho que estão resumidas na tabela 2.2. Após 0, 10, 20 e 30 min de irradiação, recolheu-se alíquotas de 1 mL para determinação de concentração de células viáveis na suspensão. Após a diluição decimal em série em PBS, procedeu-se à sementeira e contagem de colónias após incubação, tal como descrito para os ensaios com biofilmes. Cada condição experimental foi testada em 3 ensaios independentes, salvo indicado na secção de resultados.

Tabela 2.2: Bactérias, fotossensibilizadores e concentrações usados nos ensaios de inativação fotodinâmica de células planctónicas.

Bactéria	Curcumina	Tetra-Py <sup>+</sup> -Me
<i>L. innocua</i>	100 $\mu M$	1 $\mu M$
<i>S. aureus</i>	100 $\mu M$	1 $\mu M$ 5 $\mu M$

### 2.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o programa Rstudio 3.3.2. Para avaliar a significância das diferenças entre condições testadas foi aplicado o teste ANOVA. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos

A inativação fotodinâmica de biofilmes com os fotossensibilizadores curcumina e porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi avaliada de forma direta através da redução da concentração de células viáveis durante a irradiação. Nos ensaios com curcumina Figura 2.2 verificou-se que a redução máxima foi registada em biofilmes de *L. innocua* 3,4 Log, na presença de 200  $\mu M$  de curcumina e com uma dose de luz de 270 J.cm<sup>-2</sup>, correspondente a 30 min de irradiação. A variação da concentração de células viáveis nos controlos claros indica que a luz não afetou

diretamente a viabilidade das células nos biofilmes de *L. innocua*. No entanto, a exposição ao PS no escuro, causou uma redução de 1,2 Log. Em biofilmes de *S. aureus* testou-se apenas a concentração de 100  $\mu M$  de curcumina e a concentração de células viáveis foi determinada apenas no início e no fim de experiência. Verificou-se uma redução de 0,6 Log apenas nos testes irradiados na presença do PS, sendo a diferença entre os controlos e o teste não significativa ( $p > 0.05$ , ANOVA). Nos controlos claro e escuro não houve inativação das células dos biofilmes. A porfirina tetracatiónica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, testada como fotossensibilizador de referência, causou uma redução máxima de 2,1 Log e 2,2 Log em biofilmes de *L. innocua*, expostos a 10  $\mu M$  e 20  $\mu M$  de PS, respetivamente e irradiados com uma dose de luz correspondente a 270  $J.cm^{-2}$  Figura 2.3. Em biofilmes de *S. aureus* obteve-se uma redução de 2,1 Log com uma concentração de 5.0  $\mu M$  de porfirina e uma dose de luz de 270  $J.cm^{-2}$ . Nos ensaios de fotossensibilização de biofilmes com a porfirina, não houve redução de concentração de células viáveis nos controlos.

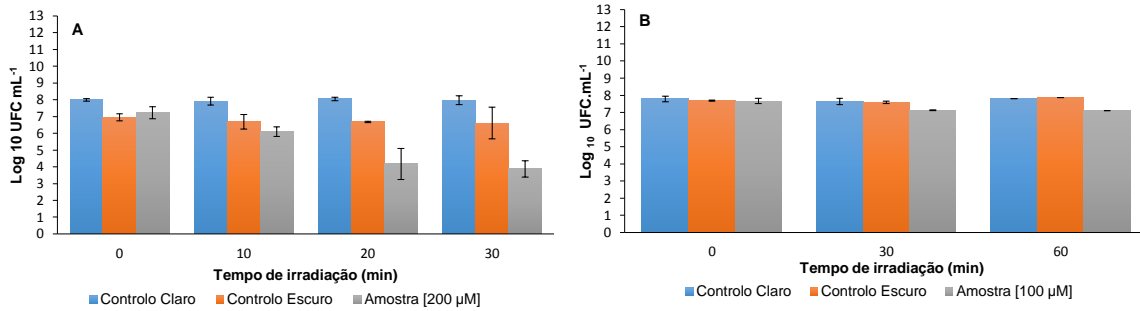


Figura 2.2: Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Listeria innocua* 200  $\mu M$  (A) e *Staphylococcus aureus* 100  $\mu M$  (B) com curcumina e irradiação com luz azul ( $150 mWcm^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes.

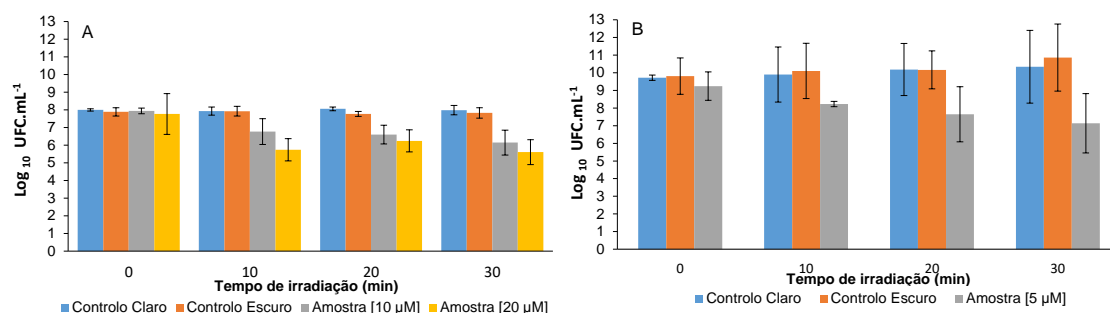


Figura 2.3: Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Listeria innocua* 10 e 20  $\mu M$  (A) e *Staphylococcus aureus* 5  $\mu M$  (B) com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e irradiação com luz branca ( $150 \text{ mWcm}^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondem a 3 ensaios independentes. No gráfico B as barras de erro correspondem às réplicas analíticas de um só ensaio.

### 2.3.2 Inativação fotodinâmica das células planctónicas

A inativação das células planctónicas com a curcumina e com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi avaliada pela redução da concentração de células viáveis durante a irradiação. Nos ensaios de inativação das células planctónicas de *L. innocua* e *S. aureus* com curcumina a redução máxima foi registada ao fim dos 30 minutos e correspondem a 8,3 Log e 3,2 Log, respetivamente Figura 2.4.

A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me utilizada como fotossensibilizador de referência causou uma redução significativa de 8,7 Log nas células planctónicas de *L. innocua*, com uma concentração de 1  $\mu M$  e uma dose de luz de  $270 \text{ J.cm}^{-2}$  Figura 2.5. Nas células livres de *S. aureus* obteve-se uma redução significativa de 5,8 Log e 6,0 Log ( $p < 0.05$ , ANOVA), expostos a uma concentração de 1.0  $\mu M$  e 5.0  $\mu M$ , respetivamente, submetidas a uma dose de luz de  $270 \text{ J.cm}^{-2}$ .



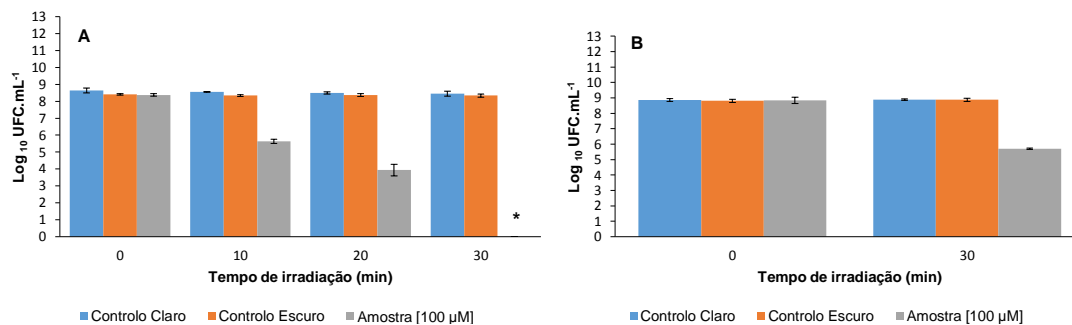


Figura 2.4: Inativação fotodinâmica de células livres de *Listeria innocua* 100 µM (A) e *Staphylococcus aureus* 100 µM (B) com curcumina e irradiação com luz azul ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes.

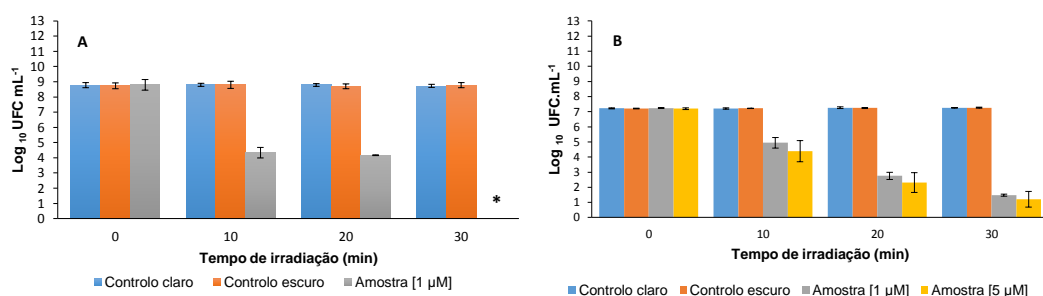


Figura 2.5: Inativação fotodinâmica de células livres de *Listeria innocua* 1 µM (A) e *Staphylococcus aureus* 1 e 5 µM (B) com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e irradiação com luz branca (300 – 700 nm) ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ). As barras de erro representam o desvio padrão correspondente a 3 ensaios independentes.

## 2.4 Discussão e conclusão

Com este estudo foi possível avaliar a inativação fotodinâmica dos biofilmes de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* e das respectivas formas planctónicas com o fotossensibilizador natural curcumina e com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, usada como fotossensibilizador de referência. Os PS usados neste estudo mostraram não ser tóxicos na ausência da luz, já que

a concentração de células viáveis nos controles escuro não variou significativamente, relativamente às concentrações iniciais. Isto confirma que a inativação foi causada apenas pelo efeito fotodinâmico do PS em combinação com a luz e que, tal como amplamente documentado para PS do grupo das porfirinas, não há toxicidade no escuro (Zhang et al., 2016). No entanto, a concentração de 200  $\mu M$  de curcumina causou uma pequena redução de concentração de células viáveis de *L. innocua* no controle escuro o que indica um efeito inibitório independente da luz. Em ensaios realizados em paralelo com o presente estudo, verificou-se que a concentração de 200  $\mu M$  de curcumina causava inativação no escuro em suspensões de *Pseudomonas aeruginosa*, ainda com que concentrações mais baixas (e.g 100  $\mu M$ ) não tivesse havido inativação na presença da luz (resultados não mostrados). A curcumina tem sido associada a diversos efeitos biológicos e é considerada como antissético contra diversos géneros de bactérias, quando aplicada em concentrações que variam entre 43 à 493  $\mu M$  (Gunes et al., 2014). Este efeito antisséptico também demonstrada em *Staphylococcus aureus* sensível à metililino (MSSA), *S. aureus* resistente à metililino (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Gunes et al., 2014).

A curcumina na concentração testada (200  $\mu M$ ) foi mais eficiente do que a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na inativação dos biofilmes de *L. innocua* causando uma redução de 3,4 Log contra os 2,1 Log obtidos com a porfirina embora seja necessário uma maior concentração de curcumina do que a porfirina. No entanto, com a porfirina não se verificou uma relação linear entre a concentração de porfirina e o fator de inativação. Quando se testou as concentrações de 10  $\mu M$  e 20  $\mu M$ , não houve variação significativa do fator de inativação o que parece indicar que nem aumentando a concentração de porfirina para um valor equivalente à concentração de curcumina, não se obteria melhores resultados. Esta diferença de eficiência pode estar relacionada com a afinidade do fotossensibilizador para as células de biofilmes ou para os constituintes da matriz, solubilidade e também com o tipo de mecanismo de inativação fotodinâmica. O mecanismo de inativação das porfirinas é tipicamente do tipo II, mediado pelo oxigénio singlete. Este tem um tempo de semi-vida muito curta e é facilmente capturado pelos compostos da matriz extracelular antes que possa atingir os alvos celulares (Rosa and Crutchley, 2002).

A curcumina é considerada um fotossensibilizador do tipo I, cujo mecanismo de ação en-

volve espécies reativas de oxigênio, que têm um tempo de vida mais longo e mais facilmente atingem os alvos celulares (Priyadarsini, 2014).

A porfirina usada foi mais eficiente do que com curcumina na inativação de biofilmes de *S. aureus*, causando uma redução de 2,1 Log contra os 0,6 Log de inativação com curcumina. Este resultado contraditório, que se observou com biofilmes de *L. innocua*, pode estar relacionada com as diferenças na composição química da matriz polimérica extracelular. *S. aureus* produz o polissacarídeo poly- $\beta$  1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG) que funciona como uma adesina e que não ocorre em biofilmes de *Listeria* (Schilcher et al., 2016). *S. aureus* produz também o ácido teicóico que não faz parte da composição da matriz de *L. innocua* (Izano et al., 2008; Silva and De Martinis, 2013). Um outro determinante de eficiência de fotossensibilização é a afinidade do PS em relação às células alvo. Neste estudo, não foi feita a quantificação do PS efetivamente ligado às células pelo que não é possível concluir sobre este aspeto (George et al., 2009).

Os biofilmes de *L. innocua* e de *S. aureus* foram menos suscetíveis aos ensaios de inativação fotodinâmica as formas planctónicas correspondentes para ambos os fotossensibilizadores testado. Tal como está dito na introdução os biofilmes são mais resistentes as suas formas planctónicas, sendo a presença da matriz polimérica extracelular que atua como uma barreira para a difusão de moléculas impedindo a penetração do PS para as células bacterianas é uma das razões para a sua resistência intrínseca (Simões et al., 2010). No entanto, suspensões de *Streptococcus mutans* e os biofilmes correspondentes mostraram suscetibilidade à inativação fotodinâmica com curcumina ativada com luz azul. Os fatores de inativação com uma dose de luz de  $54 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  foram de 2 Log em células livres, com uma concentração de  $2 \mu\text{M}$  mas de menos de 1 Log em biofilmes, mesmo que com uma concentração de PS muito mais elevada ( $60 \mu\text{M}$ ) (Manoil et al., 2014). Neste trabalho optou-se por trabalhar com duas bactérias de Gram positivo, uma vez que as bactérias de Gram negativo são normalmente menos sensíveis à inativação fotodinâmica. Vários trabalhos tem demonstrado a eficiência do PS curcumina na inativação das bactérias de Gram positivo. Winter et al., 2010, avaliaram a aplicabilidade de um polímero combinada com curcumina, nomeadamente a curcumina-polivinilpirrolidona (PVP-C) na inativação das bactérias de Gram positivo (*S. aureus*) e bactérias de Gram negativo (*Escherichia coli*). Uma concentração de  $50 \mu\text{M}$  de PVP-C, e uma dose de luz de  $33.8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  reduziu 8 Log e 3 Log de *S. aureus* e *E. coli*, respetivamente (Winter et al.,

2013). Tal como com outros PS, as bactérias de Gram negativo foram menos suscetíveis à PDI com curcumina do que as bactérias de Gram positivo. Experiência de *Streptococcus mutans* com curcumina revelaram que concentrações de 66,3  $\mu M$  a 26  $\mu M$  ativados com luz azul (24a72J.cm<sup>2</sup>) causaram reduções de até 70% na concentração de células viáveis (Tonon et al., 2015).

A curcumina apresenta a vantagem de ser um fotossensibilizador muito pequeno (peso molecular de 368 g.mol<sup>-1</sup>), tem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio, não é tóxica e apresenta excelente compatibilidade com os alimentos, foi aprovado como sendo um aditivo alimentar (E100). No entanto, apresenta a desvantagem de ser pouco eficiente em bactérias de Gram negativo e que é o tipo a que pertencem muitos patogénicos alimentares (e.g. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*). A curcumina mostrou ser também pouco eficiente na inativação de biofilmes instalados, devendo por isso ser usada mais com carácter preventivo, de redução de carga microbiana de modo a diminuir ou atrasar a constituição de biofilmes. Apresenta porém a vantagem de, para concentrações elevadas, haver um efeito antisséptico associado que pode ser interessante para o combate de bactérias de Gram negativo.

## 2.5 Bibliografia

- Abraham, S. V. P. I., Palani, A., Ramaswamy, B. R., Shunmugiah, K. P., and Arumugam, V. R. (2011). Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. Archives of Medical Research, 42(8):658-668.
- Ali, S. M., Khan, A. A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K. S., Polasa, H., Rao, L. V., Habibullah, C. M., Sechi, L. A., and Ahmed, N. (2005). Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 4(1):1-7.
- Araújo, E. A., Andrade, N., Carvalho, A., Ramos, A., Silva, C., and Silva, L. (2010). Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. Quimica. Nova, 33(9):1940-1948.
- Azeredo, J. and Oliveira, R. (2000). The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. Biofouling, 16(1):17-27.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., and Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(2):427-444.
- Beech, I. B., Sunner, J. A., and Hiraoka, K. (2010). Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. International Microbiology, 8(3):157-168.
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A., Tome, J. P., Neves, M. G., Tome, A. C., Almeida, A., and Cunha, A. (2014). Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. Photochemistry and Photobiology, 90(6):1387-1396.
- Bianchi, D., Ingravalle, F., Adriano, D., Gallina, S., Gramaglia, M., Zuccon, F., Astegiano, S., Bellio, A., Macori, G., Ru, G., et al. (2014). Reproducibility study for the detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products between official italian national laboratories. Journal of Food Protection, 77(6):999-1004.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., Consortium, L., et al. (2003). Comparison of the genome sequences of *listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. FEMS Immunology e Medical Microbiology, 35(3):207-213.
- Carpentier, B. and Cerf, O. Persistence of *listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises.(2011). International Journal of Food Microbiol, 145(1):1-8.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., and Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential

- oils and their constituents from cinnamomum osmophloeum. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1):123-127.
- Correal, J. C., Marques, E. A., Guilherme, W. L., Leão, R. S., and Damasco, P. V. (2013). Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no hospital universitário Pedro Ernesto. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 12(3).
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., and McLandsborough, L. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6):2950-2958.
- Donlan, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, 17(2):66-72.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E., and Rimbach, G. (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22):5308-5332.
- Filоче, S., Soma, K., and Sissons, C. (2005). Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(4):221-225.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The eps matrix: the house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22):7945-7947.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623-633.
- Gelatti, L. C., Bonamigo, R. R., Becker, A. P., and d’Azevedo, P. A. (2009). *Staphylococcus aureus* resistentes à metilino: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol*, 84(5):6-501.
- George, S., Hamblin, M. R., and Kishen, A. (2009). Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochemical Photobiological Sciences*, 8(6):788-795.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Moretro, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kácániová, M., Czaczyk, K., et al. (2015). Intra and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 1-26.
- Gunes, H., Gulen, D., Mutlu, R., Gumus, A., Tas, T., and Topkaya, A. E. (2014). Antibacterial effects of curcumin an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2):246-250.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance

of bacterial biofilms. *International journal of Antimicrobial Agents*, 35(4):322-332.

Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., and Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular dna in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2):470-476.

Kaplan, J. á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3):205-218.

Manoil, D., Filieri, A., Gameiro, C., Lange, N., Schrenzel, J., Wataha, J. C., and Bouillaguet, S. (2014). Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 11(3):372-379.

Meng, X., Shi, Y., Ji, W., Meng, X., Zhang, J., Wang, H., Lu, C., Sun, J., and Yan, Y. (2011). Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23):8272-8279.

Menoita, E., Santos, V., Testas, C., Gomes, C., and Santos, A. S. (2014) Biofilmes: Conhecer a entidade. *Journal of Aging Inovation*, 1 (3): 23-32

Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P. G., Johnson, M. G., and Ricke, S. C. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8):712-725.

Moreno, L. Z., Paixao, R., Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Ferreira, T. P., Hofer, E., Matte, M. H., and Moreno, A. M. (2012). Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Research in Microbiology*, 163(4):268-271.

Nuryastuti, T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., and Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6850-6855.

Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., and Imanishi, J. (2003). Antimicrobial Activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3):207-215.

Oliveira, M. M. M. d., Brugneta, D. F., and Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 69(3):277-284.

- Pereira, C. A., Romeiro, R. L., Costa, A. C. B. P., Machado, A. K. S., Junqueira, J. C., and Jorge, A. O. C. (2011). Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in medical science*, 26(3):341-348.
- Peres, F. A. S., Teixeira, L. A. C., Yokoyama, L., Campos, J. C., and Miguel, M. A. L. (2008). Treatment of cooling water with hydrogen peroxide. *Química Nova*, 31(7):1851-1855.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12):20091-20112.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3):185-194.
- Ribeiro, A. F. (2011). Validação do sistema de HACCP em cook-chill numa empresa de catering. PhD thesis, ISA/UTL.
- Rosa, M. C. and Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233:351-371.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M., and Ha, S. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4):491-509.
- Schilcher, K., Andreoni, F., Haunreiter, V. D., Seidl, K., Hasse, B., and Zinkernagel, A. S. (2016). Modulation of staphylococcus aureus biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10):5957-5967.
- Schlisselberg, D. B. and Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on salmonella typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food microbiology*, 35(1):65-72.
- Silva, E. P. and De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3):957-968.
- Silva Trentin, D., Giordani, R. B., and Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, 14(22):213-236.
- Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm



- control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4):573-583.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2):107-113.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., and Nakonieczna, J. (2012). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed research international*, 2013. 1-13.
- Team, E. E. et al. (2013). The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 18(15):20-449.
- Tetz, G. V., Artemenko, N. K., and Tetz, V. V. (2009). Effect of dnase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3):1204-1209.
- Tonon, C. C., Paschoal, M. A., Correia, M., Spolidorio, D., Bagnato, V. S., Giusti, J., and Santos-Pinto, L. d. (2015). Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *The journal of Contemporary Dental Practice*, 16(1):1-6.
- Tortik, N., Spaeth, A., and Plaetzer, K. (2014). Photodynamic decontamination of foodstuff from staphylococcus aureus based on novel formulations of curcumin. *Photochemical Photobiological Sciences*, 13(10):1402-1409.
- Van Houdt, R. and Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4):1117-1131.
- Winter, S., Tortik, N., Kubin, A., Krammer, B., and Plaetzer, K. (2013). Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochemical Photobiological Sciences*, 12(10):1795-1802.
- Zhang, L.-J., Zhang, X.-H., Liao, P.-Y., Sun, J.-J., Wang, L., Yan, Y.-J., and Chen, Z.-L. (2016). Antitumor activity evaluation of meso-tetra (pyrrolidine substituted) pentylporphyrin-mediated photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163:224-231.



## Capítulo 3

# Formulação semi-sólida de um fotossensibilizador para aplicação tópica

### Resumo

O desenvolvimento de fármacos fotossensibilizadores compatíveis com a aplicação tópica para a inativação de bactérias patogénicas representa um desafio em termos de baixa solubilidade dos fotossensibilizadores e deve satisfazer o requisito da biocompatibilidade do excipiente. O objetivo deste trabalho foi avaliação da eficiência de um creme contendo como fotossensibilizador porfirina tetracatiónica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. A eficiência de inativação foi testada sobre *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilino (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilino (MRSA), como modelos de bactérias de Gram positivo e em *Escherichia coli*, como modelo de bactéria de Gram negativo. O creme fotodinâmico colocado em contacto direto com as suspensões de MSSA não causou inativação significativa. No entanto, quando o creme foi diluído de modo a torná-lo mais fluido, obteve-se inativação completa das suspensões de MSSA e MRSA e uma redução de 2,6 Log na suspensão de *E. coli*. O creme não causou qualquer efeito tóxico sobre as células bacterianas, quando aplicado no escuro.

**Palavras chave:** Creme fotodinâmica, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Porfirina tetracatiónica

### 3.1 Introdução

A pele é um dos elementos do sistema tegumentar, cuja função é proteger o interior do organismo relativamente a variações e agressões com origem no meio externo. A pele atua como uma barreira semipermeável de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, é a primeira linha de defesa imunológica contra os microrganismos, e intervém em funções fisiológicas, incluindo o metabolismo de vitamina D (Anderson, 2014).

À pele associa-se uma microflora normal comum a maioria dos humanos. A flora normal da pele contém inúmeras bactérias, sendo dominada por *Staphylococcus* e espécies de *Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*. Podem ainda ocorrer microrganismos característicos de cavidade oral, como espécies do género *Streptococcus* e também parasitas, fungos (Grice and Segre, 2011; Anderson, 2014). Para além de microflora normal de pele, ocorrem ainda outros microrganismos que não conseguem manter uma colonização permanente. Como exemplos de bactérias constituintes desta microflora transitória podem referir-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilino (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e algumas espécies de *Bacillus*. É importante mencionar que tanto os microrganismos de microflora normal como os de microflora transitória podem em determinadas condições, tornar-se patogénicas (Anderson, 2014).

Apesar da pele constituir uma barreira eficaz contra as infeções bacterianas, muitas bactérias podem causar infeções, sendo *Staphylococcus* e *Streptococcus* os géneros mais frequentes (Grice et al., 2009). A candidíase bucal, é um exemplo de infeção fúngica dos tecidos moles provocada por *Candida sp.*. O processo de infeção pode iniciar-se a partir de lesões, tais como punções, arranhões, queimaduras ou feridas cirúrgicas (Anderson, 2014). Certas infeções na pele e tecidos moles, provocadas pela deposição e multiplicação de bactérias, podem levar a complicações graves, tais como sepsis. O acne vulgaris é um exemplo de infeção da pele causado por *Propionibacterium acnes* que afeta cerca de 70% dos adolescentes. Considerando a emergência de resistência a antibióticos em bactérias encontradas na pele, como *S. aureus* resistente à *meticilino* e a permanente necessidade de encontrar alternativas terapêuticas para o controle de infeções a terapia fotodinâmica surge como uma alternativa eficiente, de menor custo, indolor, sem efeitos colaterais que pode reduzir o tempo de reparação e a frequência

de reaparecimento das lesões tópicas (Marotti et al., 2008). Em dermatologia, esta terapia fotodinâmica é já regularmente aplicada no tratamento do cancro da pele não-melanocítico e outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipóidica (Torezan et al., 2009). A terapia fotodinâmica mostrou ser uma alternativa viável para o tratamento de acne vulgaris. O fotossensibilizador indocianina verde (ICG) causou uma redução significativa das lesões de acne com redução significativa do número de pápulas/pústulas ao fim de três sessões de ICG-PDT (Seo et al., 2016). PDT com azul de metileno lipossomal (LMB 0,1%) foi também aplicada com sucesso no tratamento de acne. Os lipossomas aumentam a penetração do PS na pele, ao diminuir a sua absorção na circulação sistémica (Moftah et al., 2016).

O tratamento fotodinâmico tópico consiste em administrar o agente fotossensibilizador e, após um determinado intervalo de tempo durante o qual o PS se acumula na região alvo proceder à irradiação de lesão com luz visível. O fotossensibilizador pode ser administrado por via intravenosa ou cutânea e o comprimento de onda de luz aplicada deve, tanto quanto possível, coincidir com o máximo de absorção do PS. As reações fotodinâmicas restringem-se ao local onde se concentre o PS e que são expostas à luz. A seletividade da PDT é produzida pelo direcionamento preferencial do fotossensibilizante para o tecido alvo e pela habilidade de se ativar o fotossensibilizador por iluminação no sítio específico da lesão (Bechet et al., 2008). Entre os fotossensibilizadores frequentemente usados no tratamento tópico encontra-se o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seu derivado lipofílico, o metil-aminolevulinato (MAL), o Photodithazine<sup>®</sup>, um derivado da clorina e6, verde de indocianina<sup>®</sup> (ICG), o Photofrin<sup>®</sup>, e o Visudyne<sup>®</sup>, uma benzoclorina. Fungos dermatófitos e leveduras em lesões interdigitais dos pés podem ser fotossensibilizados após a aplicação tópica de ALA. ALA (25%) incorporado no creme Eucerin<sup>®</sup>. O ALA-PDT teve bons efeitos terapêuticos na micose interdigital dos pés, mas as recidivas foram rápidas (Calzavara-Pinton et al., 2004). A combinação da terapia com ALA e antibióticos foi eficaz no tratamento de múltiplos abscessos na pele causados por *Micobacterium fortuitum* (Gong et al.). O PS Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ) tem revelado eficácia no tratamento de candidíase em ratinhos (Carmello et al., 2016). O efeito de PDZ foi avaliado com no tratamento fotodinâmico da candidíase oral. Induziram candidíase oral em murinos, estes foram sujeitos a cinco dias de tratamentos consecutivos com nistatina e com tratamento fotodinâmico utilizando o PS Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ). Nos animais trata-

dos com PDZ houve remissão completa das lesões orais enquanto que os que foram tratados com nistatina apresentaram uma remissão parcial das lesões orais (Carmello et al., 2016). A inativação fotodinâmica com Photofrin<sup>®</sup> é eficaz na inativação de biofilmes e de células planctónicas *Moraxella catarrhalis*, agente causador de otite média. Obteve-se uma redução de (5 – 6 Log) das células planctónicas e uma redução de (3 – 4 Log) das células organizadas em biofilmes (Luke-Marshall et al., 2014).

As vias de administração do PS através da sua incorporação em preparados farmacológicos, devem assegurar uma boa solubilização e o eficiente contacto do PS com os microrganismos alvo. Quando se pretende uma aplicação tópica sobre a pele ou unhas, podem ser usadas formulações em pastas, cremes, géis ou unguentos (González-Delgado et al., 2016). Estes preparados permitem restringir a área de aplicação, são estáveis e asseguram o contacto de pele durante o tratamento e são facilmente removidos após o tratamento. As formulações semisólidos devem preservar a forma e a estrutura do PS. Porém durante o desenvolvimento destas formulações surgem dificuldades com a baixa solubilidade do PS em água, a sua agregação em sistemas aquosos, a toxicidade no escuro ou os danos produzidos em tecidos circundantes (González-Delgado et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da eficiência de creme fotodinâmico contendo a porfirina tetracatiónica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, na inativação de três bactérias frequentemente relacionadas com infeções de pele ou feridas nomeadamente *Staphylococcus aureus* sensíveis à metililino (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à metililino (MRSA) e *Escherichia coli*.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Microrganismos e condições de crescimento

Para as experiências de inativação fotodinâmica com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, utilizou-se duas estirpes de *Staphylococcus aureus*, uma delas sensível à metililino (ATCC<sup>®</sup> 29213) e resistente (MRSA) e como modelo de bactérias de gram negativo utilizou-se *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 (*E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922). A estirpe de *S. aureus* MRSA foi cedida pela coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Biologia.

Antes de cada ensaio foram preparadas culturas frescas de cada uma das bactérias a partir de colónias isoladas em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA, Liophilchem) armazenados no frigorífico

à 4 °C por períodos não superiores a 1 mês. Para obtenção das culturas líquidas, colônias isoladas foram transferidas para frascos com 50 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB, Liophilchem). Após a incubação a 37 °C com agitação de 130 rpm durante 24h, retirou-se 500 µL desta cultura para um novo frasco contendo 50 mL de TSB. A nova cultura também foi incubada à 37 °C com agitação de 130 rpm durante 18-24h.

### 3.2.2 Formulação semi-sólida

O creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi sintetizado pelo investigador José Delgado da empresa Inovapotek. Como PS foi usada a porfirina tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) cuja estrutura química se encontra representada na Figura 3.1, uma vez que é um PS amplamente testado em bactérias, fungos e vírus (Wilkinson et al., 1995; Beirão et al., 2014; Jori, 2006). A composição do creme inclui Carbopol® 940 (0.5%, w/w), água ultra-pura, porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, etanol, propilenoglicol, trietanolamina 99.6%.

O creme com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi inicialmente produzido com concentração de 25 µM de PS. Posteriormente foi produzido com concentração [1 mM] de porfirina a fim de se obter uma maior inativação das bactérias em estudo. A solução stock de trabalho desta porfirina foi preparada em água numa concentração 100 µM e fornecida pela Inovapotek através do investigador José Delgado.

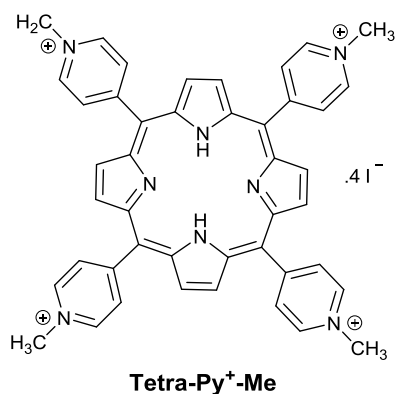


Figura 3.1: Estrutura química da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me.

### 3.2.3 Condições de irradiação

Nos ensaios de inativação utilizou-se o sistema de iluminação artificial Lumacare equipado com uma fibra ótica de luz branca (400 – 700 nm) e uma luz de intensidade de 150 mW.cm<sup>-2</sup> aplicada durante 60 min, correspondendo a uma dose total de energia de 540 J.cm<sup>-2</sup>.

### 3.2.4 Ensaios de inativação fotodinâmica com cremes

As culturas bacterianas frescas preparadas em TSB (D.O  $\approx$  0,8), foram diluídas de 1:10 em tampão fosfato salino [PBS, 3,2 g NaCl (*Sigma-Aldrich*), 0,08 g KCl (*Sigma-Aldrich*), 0,576 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*AppliChem*) e 0,096 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*AppliChem*) para 400 mL]. Os primeiros ensaios com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me contendo uma concentração de 25  $\mu$ M foram realizados em apenas MSSA. Alíquotas de 100  $\mu$ L de creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ou creme sem PS (controle negativo) foram distribuídas em microtubos esterilizados. Os microtubos foram sujeitos a uma curta centrifugação (30", 14 rpm) de modo a que todo o creme preenchesse o fundo do microtubo. Sobre a superfície do creme, em cada microtubo, colocou-se uma alíquota de 100  $\mu$ L de suspensão de células. Os microtubos foram incubadas no escuro, a 37 °C durante 60 min para adsorção do PS às células. De seguida, procedeu-se à irradiação de modo a que a luz atingisse a superfície do líquido sobre o creme. Foram preparadas 3 réplicas para cada condição experimental. No final do período de irradiação, adicionou-se a cada microtubo 800  $\mu$ L de PBS e agitou-se a mistura no vórtex. A partir destas amostras foram preparadas diluições decimais em PBS e procedeu-se à sementeira por incorporação em meio de TSA, das várias diluições para determinação de concentração de células viáveis. Foram semeadas 2 réplicas de cada diluição. Após 24h de incubação a 37 °C, procedeu-se à contagem de colónias na diluição mais adequada. A concentração de células viáveis (UFC. mL<sup>-1</sup>) foi calculada a partir de média das contagens de colónias das réplicas, corrigida para o fator de diluição.

Nos ensaios subsequentes, foi usado um creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me com 1 mM de PS. Nestes ensaios, o creme foi diluído com PBS de modo a reduzir a viscosidade e facilitar o contacto com as células bacterianas em suspensão. Para obter as diluições de trabalho, adicionou-se aos microtubos diferentes volumes de creme e PBS, de acordo com a tabela 3.1.

As concentrações de 20, 50 e 80  $\mu$ M de PS foram testadas em *S. aureus* MSSA. Em *S. aureus* MRSA e *E. coli* foram testadas apenas as concentrações de 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de PS respetivamente. Imediatamente após a mistura do creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me com a suspensão de



Tabela 3.1: Diluições do creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (1 mM)

Concentração de PS ( $\mu M$ )	Creme Tetra-Py <sup>+</sup> -Me ( $\mu L$ )	PBS ( $\mu L$ )	Suspensão bacteriana ( $\mu L$ )
100	100	600	300
80	80	620	300
50	50	650	300
20	20	680	300

células e o PBS, os microtubos foram agitados no vórtex durante 30 seg e incubados no escuro durante 60 min. A irradiação foi conduzida tal como descrito para os primeiros ensaios. No final de irradiação, o conteúdo dos microtubos foi homogeneizado no vórtex. Procedeu-se à diluição decimal em PBS e à sementeira em TSA, para determinação de concentração de células viáveis, tal como descrito para os primeiros ensaios.

Para cada ensaio foram incluídos dois controlos: controlo claro e controlo escuro. Os controlos claros foram preparados da mesma forma que as amostras, mas sem adição de PS. Os controlos escuros também foram preparados da mesma forma que as amostras mas foram mantidos ao abrigo da luz, protegidos com papel de alumínio. Foram realizadas 2 ensaios independentes para cada condição experimental.

### 3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o programa Rstudio 3.3.2. Para avaliar a significância das diferenças entre condições testadas foi aplicado o tratamento ANOVA. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 3.3 Resultados

A inativação das células livres de *S. aureus*, *MRSA* e *E. coli* com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e com a porfirina na forma dissolvida foi avaliada através da contagem das unidades formadoras de colónias (*UFC. mL*<sup>-1</sup>) antes e depois da irradiação. Nos ensaios de inativação fotodinâmica com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me [25  $\mu M$ ] não se verificou uma redução significativa do número de células viáveis de *S. aureus* Figura 3.2.

Nos ensaios com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me [1 mM], obteve-se uma redução de 4,8 Log na concentração de células viáveis de *S. aureus* (MSSA) na condição experimental correspondente

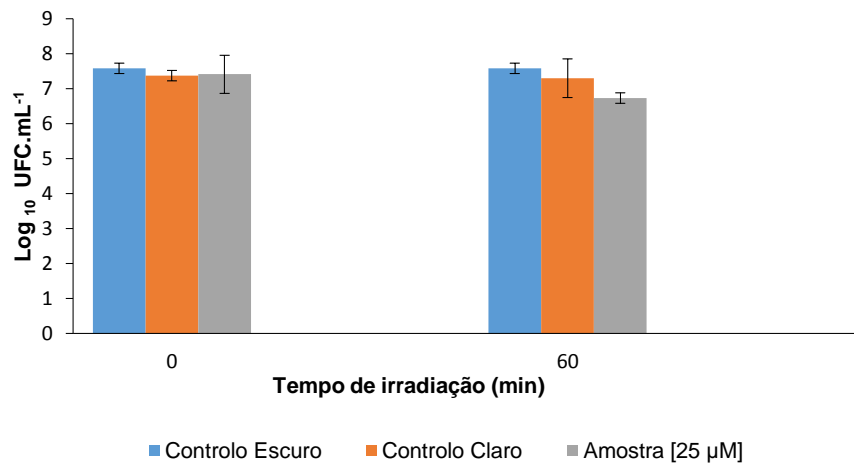


Figura 3.2: Inativação fotodinâmica de células livres de *Staphylococcus aureus* (MSSA) com creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me [25 µM] com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 mW. cm<sup>-2</sup> (540 j. cm<sup>-2</sup>).

a uma concentração efetiva de PS de 20 µM. Com as concentrações de 50 µM e 80 µM, a inativação total (7,7 Log) nas duas concentrações. Uma vez que o maior fator de inativação foi obtido com uma concentração efetiva de PS de 50 µM, foi realizado mais 1 ensaio independente para esta condição, nas quais se incluiu efetivos controlos. Estes resultados de inativação das diferentes diluições do creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me Figura 3.3.

O creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na concentração efetiva de 50 µM causou inativação total (8,0 Log) da suspensão de MRSA Figura 3.4), fim dos 60 min de irradiação.

Para inativação de *E. coli* utilizou-se o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 1 mM numa concentração efetiva de 100 µM por se tratar de uma bactéria de Gram negativo normalmente menos suscetível à PDI. A redução de número de células viáveis foi de 2,6 Log Figura 3.5.

Para verificar a ocorrência da perda de eficiência da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me quando incorporado no creme, testou-se o seu efeito em solução, não incorporada no creme na inativação das células livres de MSSA. Com uma concentração de 10 µM de PS, houve uma redução de 8,3 Log na concentração de células viáveis Figura 3.6.

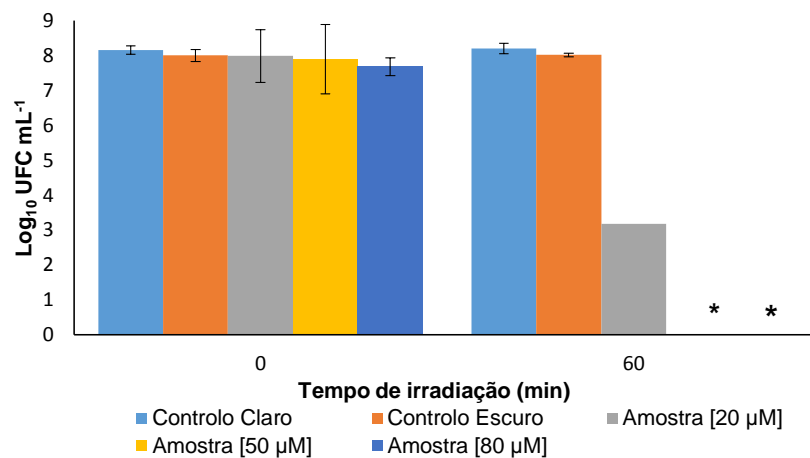


Figura 3.3: Inativação fotodinâmica de células livres de *S. aureus* MSSA com creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 1 mM nas concentrações de 20 µM, 50 µM e 80 µM com irradiação durante 60 min com a luz branca de intensidade de 150 mW. cm<sup>-2</sup> (540 J. cm<sup>-2</sup>). Estes resultados correspondem a 1 ensaio para as concentrações de 20 µM e 80 µM, e a 2 ensaios de 50 µM e controlos. (\*) Abaixo do limite de quantificação.

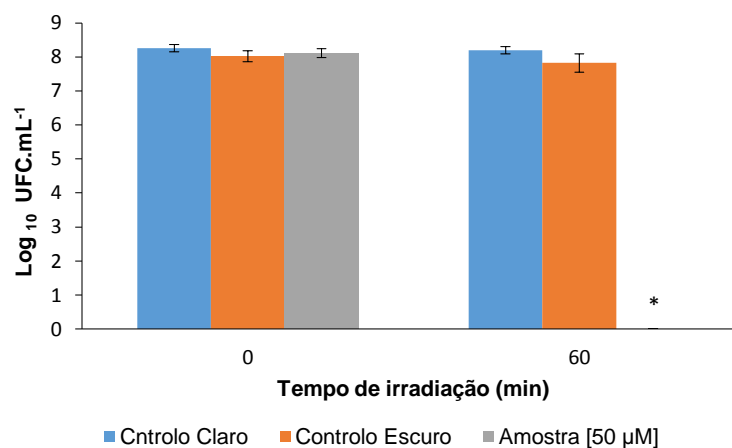


Figura 3.4: Inativação fotodinâmica de células livres de *MRSA* com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 50 µM, com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 mW. cm<sup>-2</sup> (540 J. cm<sup>-2</sup>). (\*) Abaixo do limite de quantificação.

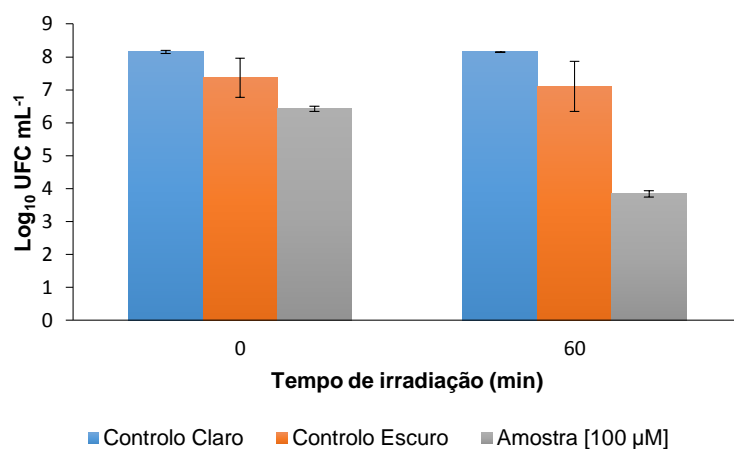


Figura 3.5: Inativação fotodinâmica de *E. coli* com o creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 100 µM, com irradiação durante 60 min, com a luz branca numa intensidade de 150 mW. cm<sup>-2</sup> (540 J. cm<sup>-2</sup>).

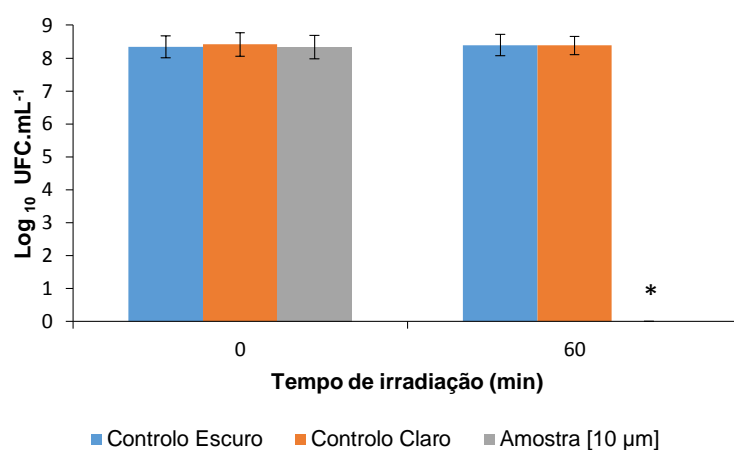


Figura 3.6: Inativação fotodinâmica de *S. aureus* MSSA com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, 10 µM, com irradiação durante 60 min com a luz branca numa intensidade de 150 mW. cm<sup>-2</sup> (540 J. cm<sup>-2</sup>). (\*) Abaixo do limite de quantificação.

### 3.4 Discussão e conclusão

A incorporação de uma porfirina catiónica numa matriz semi-sólida permitiu obter um creme fotossensibilizador que foi testado sobre bactérias de Gram positivo e de Gram nega-

tivo. O creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me em combinação com a luz branca causou inativação tanto em bactérias de Gram positivo como em bactérias de Gram negativo.

A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me em solução tem sido usada com sucesso na inativação de bactérias de Gram positivo, bactérias de Gram negativo, biofilmes, leveduras e fungos, devido ao seu caráter catiónico e excelentes propriedades físico-químicas tais como, elevada solubilidade em água e elevado rendimento quântico do oxigénio singlete (Wilkinson et al., 1995; Jori, 2006). Infelizmente, este método terapêutico não é altamente seletivo e a fotossensibilidade pode ocorrer por acumulação de PS em células não-alvo (Hora Machado, 2000). Sendo assim o desenvolvimento de formulações semi-sólidas tópicas permite aumentar a seletividade e assegurar o melhor contacto com os microrganismos da pele durante o tratamento.

Nos ensaios com o creme 25  $\mu M$ , a elevada viscosidade da matriz semi-sólida pode ter reduzido a eficiência do contacto com as células bacterianas. A viscosidade pode dificultar a libertação do PS e a geração do oxigénio singlete o que explica a perda de eficiência do PS incorporado na matriz semi-sólida. O tempo de vida do oxigénio singlete e das outras espécies reativas de oxigénio (ROS) é muito curto podendo variar de monosegundos até milisegundos, pelo que é muito importante que o oxigénio singlete seja gerado junto aos alvos celulares que são sobretudo, a parede celular e a membrana celular (Ronsein et al., 2006). A adesão específica e adequada do PS a estas estruturas normalmente é considerada suficiente para destruição da célula alvo (Pereira et al., 2014). *Chen et al.*, desenvolveram um hidrogel de quitosano contendo metilcelulose hidroxipropil (HPMC), quitosano e azul de toluidina O (TBO) para melhorar a eficácia bactericida para aplicação tópica. A eficácia da inativação fotodinâmica do hidrogel foi examinada in vitro, contra os biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O hidrogel com 20  $\mu M$  de TBO causou uma redução de 1 Log da concentração de células viáveis de *S. aureus*, enquanto que o hidrogel contendo a mistura de TBO e quitosano causou uma redução de 3,5 Log do número das células viáveis de *S. aureus*. Observou-se também uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na eficácia PDI quando a concentração de HPMC aumentou de 1% (w/w) ou acima, pois quanto maior for a concentração de HPMC maior é a viscosidade de hidrogel e este aumento de viscosidade pode dificultar a libertação do TBO e diminuir a eficácia da inativação fotodinâmica do hidrogel (Chen et al., 2015). A inativação de *P. aeruginosa* foi menor que os resultados de inativação fotodinâmica de *S. aureus* devido a camada de lipopolissacarídeos que é o principal constituinte da membrana

de *P. aeruginosa* (Chen et al., 2015).

As bactérias de Gram negativo apresentaram uma maior resistência face as bactérias de Gram positivo, isto deve-se as diferenças existentes na estrutura externa das bactérias. As bactérias de Gram positivo têm uma densa camada de peptidoglicano, composto por várias camadas individuais e homogêneas de peptidoglicano que envolvem a membrana celular, as bactérias de Gram negativo têm apenas uma fina camada de peptidoglicano à volta da membrana celular que é depois envolvida por uma membrana externa adicional, com uma estrutura lipídica (Jori, 2006).

Com a porfirina na sua forma dissolvida a redução na concentração de células viáveis foi de 8,0 Log com apenas 10  $\mu M$  de porfirina, com a porfirina incorporada na matriz semi-sólida, com 25  $\mu M$  houve uma redução de apenas 0,7 Log. Contudo essa perda de eficiência pode ser compensada aumentando a concentração do PS e a dose de energia. Assim com creme Tetra-Py<sup>+</sup>-Me numa concentração de 50  $\mu M$  e 100  $\mu M$  já se conseguiu uma redução de 8,0 Log e 2,6 Log para as bactérias de Gram positivo *MSSA* e *MRSA* e de Gram negativo *E. coli* respetivamente. Apesar da menor eficiência desta porfirina quando formulada no creme, a utilização da porfirina em solução não é muito prática para o tratamento tópico uma vez que é mais difícil assegurar o contacto com a pele durante o tratamento e a solução é considerada como menos seletiva quando comparada com as matrizes semi-sólidas.

A aplicabilidade de géis-fotodinâmico no tratamento de infeções bacterianas na pele é uma alternativa eficaz visto que permite a inativação de bactérias de Gram positivo, bactérias de Gram negativo, bactérias sensíveis e bactérias resistentes aos antibióticos. Almeida et al., 2014 mostraram que a PDI é uma alternativa eficaz na inativação de bactérias multirresistentes presentes nas águas residuais do hospital. Avaliaram a eficácia de PDI com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Houve uma redução significativa das quatro bactérias em estudo (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Acinetobacter baumani*) (Almeida et al., 2014).

Em conclusão podemos afirmar que a aplicação de formulações semi-sólidas na PDI poderá tornar-se uma alternativa eficaz na inativação de bactérias de Gram positivo, bactérias de Gram negativo e de bactérias sensíveis e resistentes aos antibióticos. A perda de eficiência do PS no creme pode ser compensada aumentando a concentração do PS, a dose de energia aplicada e diminuindo a viscosidade das formulações.

### 3.5 Bibliografia

- Almeida, J., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Costa, L., Faustino, M. A., and Almeida, A. (2014). Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochemical Photobiological Sciences*, 13(4):626-633.
- Anderson, B. (2014). *Sistema Tegumentar* -. Number vol. 4. Elsevier Health Sciences Brazil.
- Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M.-L., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M. (2008). Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology*, 26(11):612-621.
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A., Tome, J. P., Neves, M. G., Tome, A. C., Almeida, A., and Cunha, A. (2014). Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. *Photochemistry and Photobiology*, 90(6):1387-1396.
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., Capezzer, R., Sala, R., and Zane, C. (2004). Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatology, Photoimmunology Photomedicine*, 20(3):144-147.
- Carmello, J. C., Alves, F., Basso, F. G., de Souza Costa, C. A., Bagnato, V. S., de Oliveira Mima, E. G., and Pavarina, A. C. (2016). Treatment of oral candidiasis using photodithazine®-mediated photodynamic therapy in vivo. *PloS One*, 11(6):e0156947.
- Chen, C.-P., Hsieh, C.-M., Tsai, T., Yang, J.-C., and Chen, C.-T. (2015). Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue o for antimicrobial photodynamic inactivation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9):20859-20872.
- Gong, N., Tan, Y., Li, M., Lu, W., and Lei, X. (2016). Ala-pdt combined with antibiotics for the treatment of multiple skin abscesses caused by *Mycobacterium fortuitum*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 71-72
- González-Delgado, J. A., Castro, P. M., Machado, A., Araújo, F., Rodrigues, F., Korsak, B., Ferreira, M., Tomé, J. P., and Sarmiento, B. (2016). Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1):221-231.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., Bouffard, G.

- G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., et al. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324(5931):1190-1192.
- Grice, E. A. and Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4):244-253.
- Hora Machado, A. E. (2000). Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23(2).
- Jori, G. (2006). Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1-2).
- Luke-Marshall, N. R., Mang, T. S., Hansen, L. A., and Campagnari, A. A. (2014). *Moraxella catarrhalis* is susceptible to antimicrobial photodynamic therapy with photofrin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46(9):712-717.
- Marotti, J., Aranha, A., Eduardo, C. d. P., and Ribeiro, M. S. (2008). Tratamento do herpes labial pela terapia fotodinâmica. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, 62(5):370-3.
- Moftah, N. H., Ibrahim, S. M., and Wahba, N. H. (2016). Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. *Archives of Dermatological Research*, 308(4):263-268.
- Pereira, M., Faustino, M., Tomé, J., Neves, M., Tome, A., Cavaleiro, J., Cunha, Â., and Almeida, A. (2014). Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical Photobiological Sciences*, 13(4):680-690.
- Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Bechara, E., Di Mascio, P., and Martinez, G. R. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3):563-568.
- Seo, H.-M., Min, H.-G., Kim, H.-J., Shin, J.-H., Nam, S.-H., Han, K.-S., Ryu, J.-H., Oh, J.-J., Kim, J. Y., Lee, K.-J., et al. (2016). Effects of repetitive photodynamic therapy using indocyanine green for acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 55(10):1157-1163.
- Torezan, L., Niwa, A. B. M., FESTA NETO, C., et al. (2009). Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84(5):445-459.
- Wilkinson, F., Helman, W. P., and Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and



reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. an expanded and revised compilation. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 24(2):663-677.



## Capítulo 4

# Inativação fotodinâmica de fungos fitopatogénicos

### Resumo

Atualmente a contaminação das videiras e de outras árvores de fruto com fungos fitopatogénicos gera prejuízos económicos em consequência das perdas quantitativas e qualitativas, decorrentes da deterioração das árvores e dos frutos. A terapia fotodinâmica apesar de ser reconhecidamente uma abordagem muito promissora no controle de microrganismos, está ainda pouco explorado no controle de fungos fitopatogénicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de inativação fotodinâmica de fungos fitopatogénicos, agentes de deterioração de frutos com fotossensibilizadores naturais (curcumina e riboflavina) e sintéticos (porfirina tetracatiónica e azul de toluidina O). Como fungos modelo foram testados *Botrytis cinerea* e *Lasiodiplodia theobromae*. A irradiação foi conduzida por exposição à luz solar.

Na presença de 500  $\mu M$  Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ou de 500  $\mu M$  de TBO, o crescimento de *L. theobromae* foi inibido em 35,1% e 26,5% relativamente ao controle claro e controle escuro, respetivamente. No entanto, a exposição à luz solar na presença de curcumina ou de riboflavina não causou inativação. A exposição à luz solar na presença da porfirina ou de TBO também afetou negativamente o crescimento de *B. cinerea*, causando uma redução no seu crescimento de 89,7% e 93,2% relativamente ao controle escuro respetivamente. No entanto, a luz inibiu diretamente o crescimento da estirpe usada nos ensaios, mesmo na ausência de PS. Os resultados revelam que os PS sintéticos podem ser usados para o controle de fungos fitopa-

togénicos, mas os PS naturais curcumina e riboflavina não constituem, uma alternativa viável.

**Palavras chave:** *Terapia fotodinâmica, Fungos fitopatogénicos, Lasiodiplodia theobromae, Botrytis cinérea, curcumina, riboflavina, porfirinas catiónicas, azul de toluidina O.*

## 4.1 Introdução

Os fungos filamentosos são agentes de doenças de diversas plantas de interesse económico, nomeadamente de árvores de fruto (Van Kan et al., 2016). No contexto económico português, as doenças da videira assumem particular relevância (Climaco et al., 2012). A contaminação das videiras, por fungos ocorre durante as fases de pré-colheita, colheita e processamento das uvas (Magnoli et al., 2003). Durante estes períodos, a temperatura e a humidade constituem fatores importantes no crescimento micelial e na germinação de conídios (Oliveri et al., 2016). O desenvolvimento de fungos em videiras representa importantes perdas quantitativas e qualitativas, decorrentes da contaminação e deterioração dos frutos, descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis inviabilizando assim a sua comercialização e a sua aplicação em vinificação (Van Kan et al., 2016). Na indústria alimentar, os fungos são responsáveis por cerca de 80% a 90% do total das perdas pós-colheita causando, deste modo, elevados prejuízos económicos e ecológicos (Van Kan et al., 2016).

De acordo com o seu estilo de vida, os fungos fitopatogénicos vegetais podem ser classificados como biotróficos ou necrotróficos. Os biotróficos não se desenvolvem em restos de culturas, semente ou material orgânico morto, pois dependem do hospedeiro vivo para completarem o seu ciclo de vida. Os oídios constituem exemplos desta categoria. Os necrotróficos adquirem os seus nutrientes a partir das células mortas. Parasitam o tecido vegetal e posteriormente produzem toxinas que causam a morte de tecidos da planta originando manchas foliares. *Botrytis cinerea* e *Lasiodiplodia theobromae* são exemplos de fungos necrotróficos (Dean et al., 2012).

*Botrytis cinerea* é um fungo pertencente à classe *Leotiomyces*, da família *Sclerotiniaceae*. Infeta cerca 1.400 espécies de plantas incluindo muitas culturas de importância económica. Causa "podridão cinzenta" em mais de 200 espécies de plantas como por exemplo, morangueiro, tomateiro, videira (Silvera-Pérez et al., 2010; Dean et al., 2012). Afeta folhas, caules, flores e frutos, causando grandes perdas após a colheita (Nakajima and Akutsu, 2014).

*Lasiodoplotia* ocorre principalmente em regiões tropicais e temperadas sendo responsável por uma grande variedade das doenças nas plantas. Este fungo penetra nas plantas através de lesões provocadas por insetos, pássaros ou pelo homem, no contexto de práticas agrícolas. Existe também evidências de que *Lasiodoplotia* pode colonizar as plantas sem causar sintomas de infecção. Algumas hipóteses sugerem que a evolução de *Lasiodoplotia* desse comportamento endófito para o parasitismo pode ser explicada em consequência de pressões ambientais (Lima et al., 2013).

Recentemente, tem havido um aumento do leque de hospedeiros e agravamento da severidade das infecções provocadas por *Lasiodoplotia theobromae*. Este fungo pode infectar videiras, citrinos, coqueiros, eucaliptos argentino, jaqueira, mandioca, meloeiro, figueira, mangueira, goiabeira, mamoeiro, roseira e abacateiro. A infecção manifesta-se por sintomas de morte, cancro em ramos, caules e raízes, lesões nas folhas, frutos e sementes, além de provocar a morte de mudas e enxertos (Freire et al., 2004).

Na tentativa de minimizar os impactos negativos dos fungos no rendimento da produção agrícola, o controle químico é uma prática comum (Berger et al., 2011). No entanto, o uso intensivo de substâncias químicas na agricultura representa riscos ambientais com consequências à saúde humana, uma vez que a maioria dos pesticidas químicos são altamente tóxicos e não são seletivos, eliminando, indiscriminadamente, organismos que são úteis ao ecossistema (Berger et al., 2011). Nas fases iniciais de contaminação, a vinha encontra-se numa fase de crescimento lento, pelo que a área foliar exposta às contaminações é, ainda pequena sendo assim, nesta fase os primeiros tratamentos entre as folhas livres e os cachos visíveis, devem ser fungicidas com ação simples de contacto ou superfície (e. g. Captana<sup>®</sup>, folpete<sup>®</sup>, Mancozebe<sup>®</sup>, Metirame<sup>®</sup>, Propinebe<sup>®</sup> e Tolifluanida<sup>®</sup>, simples ou em mistura com Cimoxanil<sup>®</sup>). Embora não seja invulgar o uso de produtos sistémicos ou penetrantes não é aconselhável porque são mais caros que os produtos de contacto e poderiam desencadear resistências que comprometeria a sua eficácia em fases posteriores do desenvolvimento da planta. O hidróxido de cobre e sulfato de cobre, simples ou em mistura com outras substâncias activas tais como mancozebe e cálcio são os fungicidas sistémicos mais utilizados. Na fase de floração não se deve utilizar os fungicidas com cobre devido a sua fitotoxidade que pode levar à destruição das flores além ocasionar problemas de polinização (Amaro, 2003). No meio ambiente os fungicidas químicos dissolvidos nas águas de irrigação e/ou chuvas alcançam o

solo e podem sofrer degradação por ação de luz ou calor, interagir com outras partículas e ser lixiviados até os rios e lençóis freáticos, contaminando águas superficiais e subterrâneas (Berger et al., 2011). Iprodiona<sup>®</sup>, Benomil<sup>®</sup>, Captana<sup>®</sup> e o Penconazol<sup>®</sup> são usados para prevenir infecções por *L. theobromae* em lesões, desde que aplicada antes da instalação com o fungo (Leavitt, 2003). No entanto, são fitotóxicos, quando aplicados em concentrações elevadas. Alguns apresentam elevada persistência e outros ainda, foram retirados do mercado (Niekerk et al., 2006).

Os métodos biológicos representam uma alternativa para o biocontrole de fungos fitopatogênicos (Júnior et al., 2000). Envolvem o uso de organismos ou dos seus produtos metabólicos para a prevenção de doenças em plantas numa estratégia de "*controle de um microorganismo por outro microorganismo*" (Júnior et al., 2000). Trata-se de um método seguro, ecologicamente viável e de efeito fungistático (Berger et al., 2011). O *Sporidiobolus pararoseus*, isolado das plantas de lírio, apresenta potencial para a redução da incidência e severidade das infecções com *Botrytis cinerea* (Machado and Bettiol, 2010).

Alguns compostos funcionam como elicitadores ou ativadores de mecanismos de defesa das plantas. É o caso do quitosano, um polímero biológico obtido por deacetilação da quitina (Berger et al., 2011). O quitosano apresenta propriedades específicas de bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxidade, permeabilidade seletiva, atividade antimicrobiana, capacidade de formar geis e filmes, capacidade de quelação e de adsorção (Rinaudo, 2006). O quitosano causa inibição em fungos, bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo. No entanto, o efeito antimicrobiano é mais imediato em fungos do que em bactérias. O quitosano inibe a atividade de poligalacturonases fúngicas, estimulando a produção de fitalexinas na planta e estimulando a síntese de enzimas (e.g. quitinase, quitosanase e peroxidase) que inibem o crescimento do fungo (Knowles and Roller, 2001).

A inativação fotodinâmica é uma alternativa para o controle de fungos através da aplicação de um fotossensibilizador que se liga à superfície do micélio ou dos esporos ou que se acumula no compartimento intracelular (Gonzales et al., 2010). As características físico químicas da superfície celular influenciam na seletividade e eficácia dos fotossensibilizadores (Usacheva et al., 2008). A membrana citoplasmática e a parede celular dos fungos são carregados negativamente, o que favorece a ligação de fotossensibilizadores catiónicos tais como, azul de toluidina O e porfirinas catiónicas. A interação de fungos, particularmente na forma espo-

rulada, exige concentrações de PS e doses de luz mais elevadas do que as necessárias para inativar células vegetativas e endósporos bacterianos, pois os fungos são protegidos por uma parede celular rígida composta principalmente por polímeros de polissacarídeo insolúvel, como a quitina,  $\beta$ -glucano e glicoproteínas (Calzavara-Pinton et al., 2005; Vandresen et al., 2016).

A desvantagem da terapia fotodinâmica em comparação com os fungicidas convencionais, para controle de doenças fúngicas da planta, é que esta abordagem depende da luz e por isso não funciona durante a noite (Fracarolli et al., 2016). Os PS devem ter boa afinidade para as estruturas alvo dos fungos e devem ser também fotoestáveis para assegurarem um tratamento prolongado (Pereira et al., 2014). Alguns fotossensibilizadores ligam-se a superfície externa da célula, e penetram no seu interior apenas se a parede celular for danificada, o que pode ocorrer durante a fotossensibilização (Jori, 2006). Severas deformidades e ruptura da parede celular, tanto em microconídios como de micélios foram observadas após a fotossensibilização *Trichophyton rubrum* com a Sylsens B, cujo princípio ativo é tricloreto de 5-fenil-10,15,20-tris(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Smijs et al., 2009). O efeito apenas foi observado após a ligação da porfirina catiónica à superfície externa das paredes de conídios e hifas (Smijs et al., 2008). Os PS usados na inativação dos fungos nas plantas normalmente são menos tóxicas para os seres humanos e animais e são menos agressivos para as plantas que a maioria dos fungicidas utilizadas atualmente (Menezes et al., 2014b). A identificação e o desenvolvimento de PS com potencial para serem usados como antifúngicos na agricultura serão de extrema utilidade para o desenvolvimento de novos fungicidas com mecanismo de ação diferente dos fungicidas atualmente utilizados. Os fungos fitopatogênicos temos os derivados fenotiazínicos nomeadamente o azul de metileno (MB), novo azul de metileno (NMBN), azul de toluidina O (TBO) e fenotiazina pentacíclico S137 Tetra-Py<sup>+</sup>-Me são exemplos de PS usados na PDI de fungos. A hematoporfirina também é muito utilizado na inativação de fungos fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae*, *Fusarium culmorum*, *Acremonium strictum*, *Trichothecium roseum* and *Rhizopus oryzae*) geralmente com relevância na indústria alimentar (Luksiene et al., 2003).

Uma das alternativas na busca de PS para inativação de microrganismos na agricultura são o uso de PS naturais tais como curcumina e riboflavina, visto compostos são aditivos alimentares autorizados e apresentam um reduzido risco de contaminação das partes comestíveis, nomeadamente frutos (Priyadarsini, 2014; Thakuri et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fotossensibilizadores sintéticos e naturais como fungicidas fotodinâmicos, para potencial aplicação em plantas cultivadas. Como fungos modelo foram usados isolados de *B. cinerea* e *L. theobromae*. Como fonte de luz foi usada luz solar, no sentido de avaliar a aplicabilidade de abordagem em condições mais semelhantes às condições de campo.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Microrganismos e condições de crescimento

O isolado de *Botrytis cinerea* usado neste trabalho foi cedido pela Micoteca da Universidade do Minho. O isolado de *Lasioidiplodia theobromae* foi cedido pelo professor Artur Alves (Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, CESAM).

Antes de cada ensaio foi realizado uma repicagem dos fungos *Botrytis cinerea* e *Lasioidiplodia theobromae* de uma placa de *Potato Dextrose Agar* (PDA, *Liophilchem*) ou *Agar Aveia* respetivamente, para novas placas meio de cultura que foram incubadas na estufa de 25 °C

### 4.2.2 Fotossensibilizadores

Como fotossensibilizadores de referência foram testados uma porfirina tetra catiónica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) e o corante azul de toluidina O (TBO) cujas estruturas químicas se encontram representadas na Figura 4.1. As soluções stock (500  $\mu$ M) foram preparados em dimetil sulfóxido (DMSO). Como fotossensibilizadores naturais testou-se curcumina e riboflavina. As soluções stock (1 mM) de curcumina (*Alfa Aesar*) e riboflavina (*Sigma*) foram preparadas em acetona ou numa solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M.

As soluções stock foram protegidas de luz com papel de alumínio de modo a evitar a fotodegradação e conservadas a 4 °C. Antes de cada ensaio as soluções-stock foram sonificadas (Silvercrest) durante 30 minutos a fim de assegurar a homogeneidade das soluções.



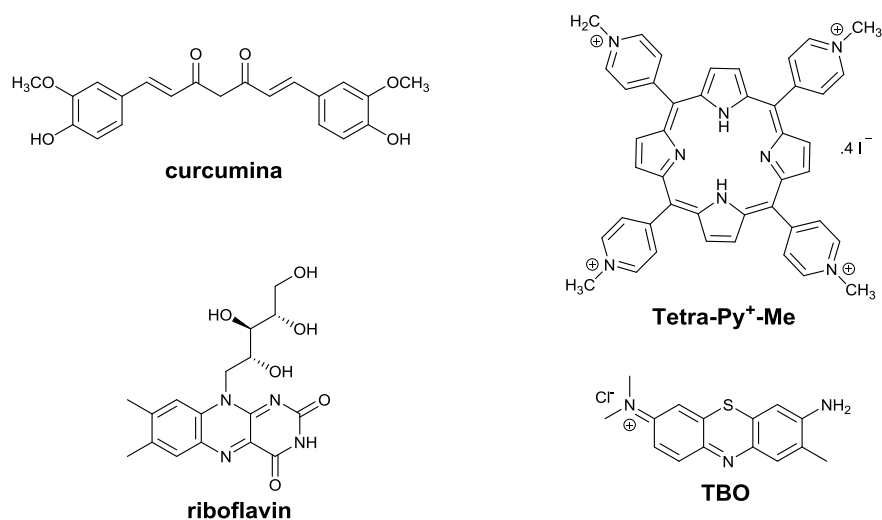


Figura 4.1: Estrutura química de fotossensibilizadores naturais e sintéticos testados nas experiências de inativação fotodinâmica de fungos.

#### 4.2.3 Ensaios de inativação fotodinâmica

A avaliação do efeito fotodinâmico foi feita por medição da variação do diâmetro das colónias em meio sólido. Como meio de cultura usou-se PDA para *B. cinerea* e agar de Aveia para *L. theobromae*. As soluções de PS foram adicionadas à superfície do meio (100  $\mu\text{L}$ ) e espalhadas assepticamente com um espalhador. Na base de placa de meio de cultura (face exterior) foram traçados dois diâmetros perpendiculares. O fungo foi inoculado por picada no centro de placa, no ponto correspondente à interseção das linhas. As placas de cultura foram incubadas durante 7 dias à temperatura ambiente (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ) e em condições de exposição à luz solar natural.

Durante o período de incubação, procedeu-se à medição diária do tamanho das colónias registando o comprimento dos raios a partir das quais foi calculado o raio médio. Todos os ensaios incluíram dois controlos: um controlo claro e um controlo escuro. Os controlos claros foram preparados da mesma forma que os testes, sem adição de PS. Os controlos escuros foram também preparados da mesma forma que os testes, mas foram mantidos ao abrigo da luz, protegidos com papel de alumínio, durante as experiências. Em cada ensaio foram preparadas 3 placas (réplicas) para cada condição (teste, controlo claro e controlo escuro).

Foram realizados três ensaios independentes para cada condição experimental.

#### 4.2.4 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o programa Rstudio 3.3.2. Para avaliar a significância das diferenças entre condições testadas foi aplicado o teste ANOVA. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativa.

### 4.3 Resultados

A variação do raio médio das colónias de *L. theobromae* na presença dos fotossensibilizadores TBO e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, curcumina e riboflavina encontram-se representados na Figura 4.2. Os PS naturais curcumina e riboflavina não causaram inativação significativa, sendo os valores do raio médio nos testes idênticos aos valores registados nos controlos. No entanto, houve inibição do crescimento na presença dos PS sintéticos TBO e porfirina sob exposição à luz solar. O TBO causou uma ligeira inibição do crescimento na amostra em relação aos controlos (26,5% do CE no 7<sup>o</sup> dia). No entanto, essa diferença de crescimento entre as amostras e os controlos após 7 dias de incubação não é uma diferença estatisticamente significativa.

A porfirina causou uma redução do crescimento relativamente aos controlos Figura 4.2.

A redução relativamente aos controlos foi máxima no segundo dia de incubação (90% do CC). Durante o decorrer da experiência, o crescimento das colónias no controlo claro estabilizou ao fim de 5 dias de incubação mas continuou a aumentar no teste com a porfirina e no final da experiência o raio médio no teste correspondia a 64,9% do raio médio do controlo claro Figura 4.3.

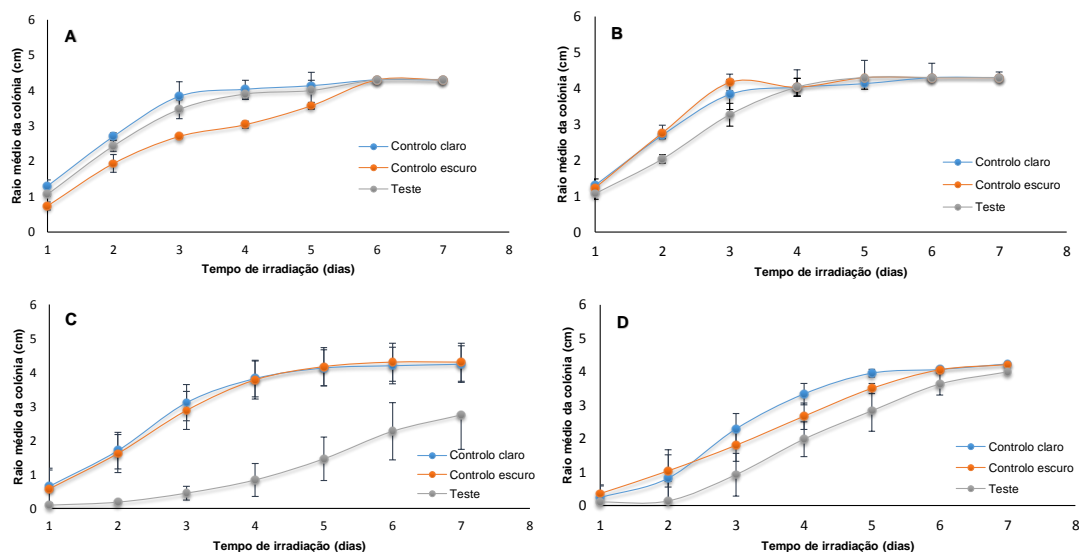


Figura 4.2: Variação do raio médio das colónias de *L. theobromae* em meio de agar aveia, sob exposição à luz solar natural durante 7 dias, na presença de 1 mM de curcumina (A), 1 mM de riboflavina (B), 500 μM de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (C) e 500 μM de TBO (D). Os valores correspondem a 1 ensaio com curcumina e riboflavina e 3 ensaios independentes com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO.

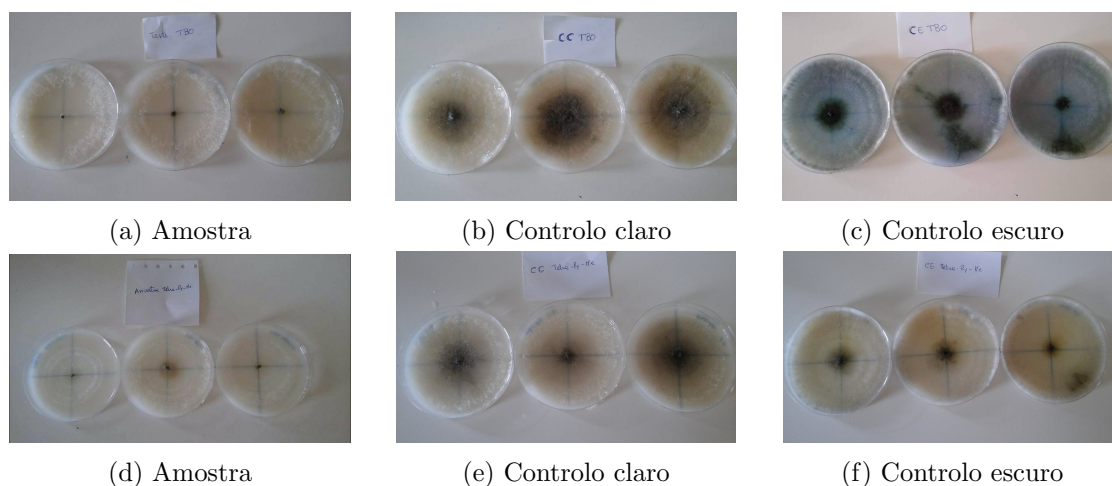


Figura 4.3: Exemplos do desenvolvimento das colónias de *L. theobromae* ao fim de 7 dias de incubação sob exposição a luz natural, na presença dos fotossensibilizadores TBO 500 μM (a, b, c) e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 500 μM (d, e, f).

A variação do raio médio das colónias de *B. cinerea* na presença dos fotossensibilizadores TBO e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, curcumina e riboflavina encontra-se representado na Figura 4.4. A luz solar, na ausência de PS, atenuou o crescimento de *B. cinerea* em 0% e 73% relativamente

ao CE para curcumina e riboflavina respetivamente. Os PS naturais curcumina e riboflavina não causaram inativação significativa, sendo os valores do raio média nos testes idênticos aos valores registados nos controlos. No entanto, houve uma ligeira inibição do crescimento na presença dos PS sintéticos TBO e porfirina sob exposição à luz solar. A porfirina causou uma redução do crescimento de 89,7% relativamente ao controlo escuro Figura 4.4. A redução foi máxima ao sexto dia de incubação (91,2% do CE). No final da experiência o raio médio no teste correspondia a uma redução de 89,7% relativamente ao raio médio do controlo escuro.

O TBO também causou uma redução do crescimento em relação ao controlo escuro. A redução máxima ocorreu no sétimo dia de incubação (93,2% do CE) Figura 4.5.

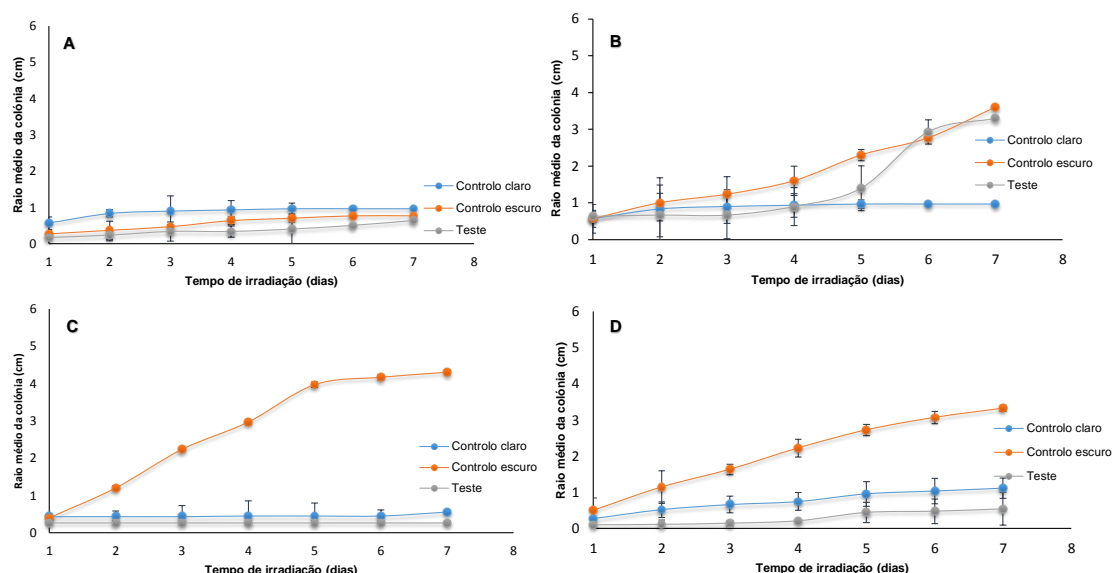


Figura 4.4: Variação do raio médio das colónias de *B. cinerea* em meio de PDA, sob exposição à luz solar natural durante 7 dias, na presença de 1 mM de curcumina (A), 1 mM de riboflavina (B), 500  $\mu$ M de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (C) e 500  $\mu$ M de TBO (D). Os correspondem a 1 ensaio com curcumina e riboflavina e 3 ensaios independentes com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO.

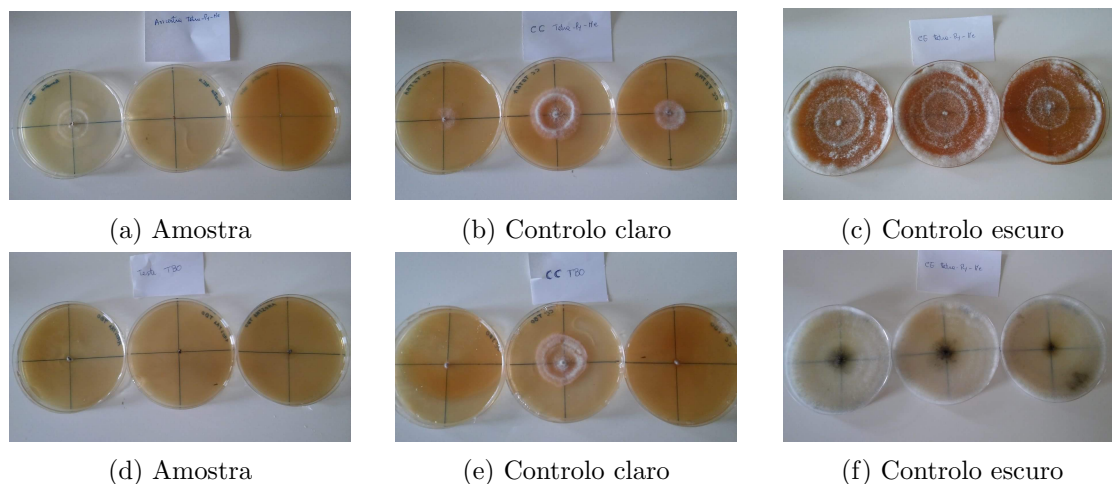


Figura 4.5: Exemplos do desenvolvimento das colônias de *Botrytis cinerea* ao fim de 7 dias de incubação sob exposição a luz natural, na presença dos fotossensibilizadores Tetra-Py<sup>+</sup>-Me 500  $\mu$ M (a, b, c) e TBO 500  $\mu$ M (d, e, f).

#### 4.4 Discussão e conclusão

O tratamento fotodinâmico antifúngico tem sido uma alternativa promissora ao uso de fungicidas convencionais e pode ser utilizado para reduzir a densidade de fungos patogênicos no ambiente. Neste trabalho avaliou-se em condições laboratoriais a eficiência de inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores representativos de grupos de PS naturais (curcumina e riboflavina) e sintéticos (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO) como alternativa para o controle de fungos *L. theobromae* e *B. cinerea*.

As porfirinas catiônicas e os corantes (azul de toluidina O e azul de metileno) têm demonstrado ser PS adequados na inativação de fungos fitopatogênicos (Vandresen et al., 2016; Menezes et al., 2014b).

Os PS Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO causaram um ligeira inibição do crescimento de *L. theobromae* em relação aos controles mostrando ser eficazes na inativação fotodinâmica de *L. theobromae*. Porém, a inibição do crescimento de *L. theobromae* com porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me em relação ao controle claro foi de 35,1% enquanto que com o corante TBO a redução do crescimento em relação ao controle escuro foi de 26,5%. Este resultado pode ser devido ao fato desta porfirina apresentar um maior rendimento de oxigênio singlete em relação aos corantes e ser mais fotoestável que o TBO. Observou-se uma ligeira atenuação no crescimento de *L. theobromae* nos dois primeiros dias na presença da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ou do corante

TBO. Uma vez que após o atraso inicial no crescimento do fungo houve recuperação do crescimento nos testes, relativamente aos controlos, a repetição das aplicações pode melhorar a eficiência da PDI em condições de campo.

*B. cinerea* apresentou sensibilidade à luz que se traduziu em inibição do crescimento nos controlos claros, relativamente aos controlos escuros (68,1 a 73,3%).

O corante TBO apresentou sinais de toxicidade no escuro para *L. theobromae* visto que entre o terceiro e o quinto dia de incubação a redução do raio médio no controle escuro relativamente ao controle claro foi de apenas 25,1%.

O uso de fotossensibilizadores naturais (curcumina e riboflavina) na agricultura seria de uma grande valia, uma vez que são mais baratas, fazem parte da nossa dieta e o seu uso em doses elevadas normalmente não causa toxicidade aos humanos (Priyadarsini, 2014; Souza et al., 2005). No entanto, estes PS naturais são pouco fotoestáveis. A presença de luz e do oxigénio influenciam a sua degradação (Laczkowski and Sousdaleff, 2013). Os PS naturais curcumina e riboflavina não causaram inativação significativa dos fitopatogénicos em estudo.

No ensaio de inativação de *L. theobromae* com curcumina observou-se também uma redução do crescimento no teste mas não houve inativação significativa no controle escuro apesar das antissépticas da curcumina (Anand et al., 2008). Esta redução no teste pode ser devido ao efeito fotodinâmico observado nos dois primeiros de incubação, fato que levou a menor crescimento no teste em relação aos controlos.

Apesar da escassez de estudos de inativação fotodinâmica de fungos filamentosos esta terapia é promissora na inativação de fungos fitopatogénicos. Vandresen et al., 2016 avaliaram a eficiência de cinco porfirinas catiónicas meso-(1-methyl-4-pyridinio) na inativação de conídios de *Colletotrichum gramnicola*. As porfirinas catiónicas foram considerados eficientes fotossensibilizadores para inativação dos conídios. Menezes et al., 2014 avaliaram os efeitos de inativação fotodinâmica com quatro fenotiazinas (azul de metileno [MB], novo azul de metileno N [NMBN], azul de toluidina [TBO] e o fotossensibilizador S137) em conídios de *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*. A MIC do PS S137 foi de 5  $\mu M$  para as três espécies de fungos utilizando uma fluência de luz de 25  $J. cm^{-2}$ . Com o NMBN [50  $\mu M$ ] e S137 [10  $\mu M$ ], houve uma redução de  $\approx 5$  Log) na sobrevivência dos conídios de todas as espécies em estudo.

A curcumina foi também testada com sucesso na inativação fotodinâmica dos esporos

de *Aspergillus flavus*. Conseguiu-se uma redução na contagem dos esporos fúngicos de até  $3 \text{ Log UFC mL}^{-1}$  em suspensão e uma redução de  $2 \text{ Log UFC g}^{-1}$  em grãos de milho experimentalmente contaminados, com  $100 \mu\text{M}$  de curcumina e uma dose de luz de  $84 \text{ J.cm}^2$ . É assim considerada um método potencialmente eficaz na descontaminação dos alimentos e sementes (Temba et al., 2016). Uma das vantagens da aplicação da terapia fotodinâmica é o fato ser uma estratégia multi-alvo, sendo pouco provável o desenvolvimento de resistência. No entanto a sua aplicação em grandes áreas é uma das dificuldades que ainda é preciso ultrapassar encontrando fotossensibilizadores simultaneamente fotoestáveis e a baixo custo. Outra limitação da aplicação desta terapia na agricultura baseia-se no fato de funcionar somente durante o dia permitindo que as hifas recuperem de danos sub-letais e possam crescer durante a noite.

## 4.5 Bibliografia

- Amaro, P. (2003). Manual técnico de protecção integrada da vinha na região norte. Ed., Pedro Amaro, INIAP, Lisboa.
- Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., harakan, S. T., Misra, K., Priyadarsini, I. K., Rajasekharan, K. N., et al. (2008). Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. *Biochemical pharmacology*, 76(11):1590-1611.
- Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., and Stamford, N. P. (2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(4):195-215.
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., and Sala, R. (2005). A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(1):1-6.
- Climaco, P., Ricardo-da Silva, J. M., Laureano, O., de Castro, R., and Tonietto, J. (2012). O clima vitícola das principais regiões produtoras de uva para vinho de portugal. Tonietto, Jorge; Sotés Ruiz, Vicente; Gómez-Miguel, Vicente D. *Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas ibero-americanas*, pages 313-357.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4):414-430.
- Fracarolli, L., Rodrigues, G. B., Pereira, A. C., Júnior, N. S. M., Silva-Junior, G. J., Bachmann, L., Wainwright, M., Bastos, J. K., and Braga, G. U. (2016). Inactivation of plant-pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* with natural plant-produced photosensitizers under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162:402-411.
- Freire, F., Viana, F., Cardoso, J., and dos SANTOS, A. (2004). Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. Embrapa Agroindústria Tropical; Comunicado Técnico: 1-6
- Gonzales, F. P., Da Silva, S. H., Roberts, D., Braga, G. U., et al. (2010). Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3):653-661.
- Jori, G. (2006). Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspec-



- tives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1-2).
- Júnior, A. G., dos Santos, A. F., and Auer, C. G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta*, 30(12):155-165.
- Knowles, J. and Roller, S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 64(10):1542-1548.
- Laczowski, I. and Sousdaleff, M. (2013). Microencapsulação de curcumina com maltodextrina, avaliação da estabilidade e aplicação em alimentos. *Memories: VIII Encontro de Produção Científica e Tecnológica, Campo Mourão-PR*.
- Leavitt, G. (2003). The occurrence, distribution and control of *Botryodiplodia theobromae* on vitis vinifera in california, arizona and north mexico. In *Proceedings of the third International Workshop on Grapevine Trunk Diseases*. Christchurch, New Zealand, 1-2 Feb 2003.
- Lima, J., Moreira, R., Cardoso, J., MARTIN, M., and Viana, F. (2013). Caracterização cultural, morfológica e patogênica de lasiodiplodia theobromae associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathologica*, 39(2):81-88.
- Luksiene, Z., Peciulyte, D., and Lugauskas, A. (2003). Inactivation of fungi in vitro by photosensitization: preliminary results. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 11(2):215-220.
- Machado, M. and Bettiol, W. (2010). Potencial para o biocontrole de botrytis cinerea por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45:539-545.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., and Dalcerro, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of aspergillus section nigri in wine grapes in argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37(2):179-184.
- Menezes, H. D., Rodrigues, G. B., de Pádua Teixeira, S., Massola, N. S., Bachmann, L., Wainwright, M., and Braga, G. U. (2014). In vitro photodynamic inactivation of plantpathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5):1623-1632.
- Nakajima, M. and Akutsu, K. (2014). Virulence factors of botrytis cinerea. *Journal of General Plant Pathology*, 80(1):15-23.
- Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Hallenn, F., and Crous, P. (2006). *Botryosphaeria spp.* as

- grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(4):43-54.
- Oliveri, C., Bella, P., Tessitori, M., Catara, V., and La Rosa, R. (2016). Grape and environmental myco ora monitoring in old, traditionally cultivated vineyards on mount etna, southern italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Pereira, M., Faustino, M., Tomé, J., Neves, M., Tome, A., Cavaleiro, J., Cunha, Â., and Almeida, A. (2014). Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical Photobiological Sciences*, 13(4):680-690.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12):20091-20112.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7):603-632.
- Silvera-Pérez, A. E., Sanhueza, R. M. V., Duarte, V., Santos, H. P. d., and Felippeto, J. (2010). Controle do mofo cinzento com *clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology*. Brasilia, DF. Vol. 35, 163-169.
- Smijs, T. G., Mulder, A. A., Pavel, S., Onderwater, J. J., Koerten, H. K., and Bouwstra, J. A. (2008). Morphological changes of the dermatophyte *trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. *Medical Mycology*, 46(4):315-325.
- Smijs, T. G., Pavel, S., Talebi, M., and Bouwstra, J. A. (2009). Preclinical studies with 5, 10,15-tris (4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21h, 23h]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Trichophyton rubrum*. *Photochemistry and Photobiology*, 85(3):733-739.
- Souza, A. C. S., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., Cavagis, A. D. M., and Peppelenbosch, M. P. (2005). Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*, 28(5):887.
- Temba, B. A., Fletcher, M. T., Fox, G. P., Harvey, J. J., and Sultanbawa, Y. (2016). Inactivation of *Aspergillus avus* spores by curcumin-mediated photosensitization. *Food Control*, 59:708-713.
- Thakuri, P., Joshi, R., Basnet, S., Pandey, S., Taujale, S., and Mishra, N. (2011). Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. *Nepal Medical College Journal*, 13(4):281-284.
- Usacheva, M., Teichert, M., Usachev, Y., Sievert, C., and Biel, M. (2008). Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas*

*aeruginosa* cells. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(1):55-61.

Van Kan, J. A., Stassen, J. H., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A., Faino, L., Farmer, A. D., Papasotiriou, D. G., Zhou, S., Seidl, M. F., Cottam, E., et al. (2016). A gapless genome sequence of the fungus *botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*.

Vandresen, C. C., Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R. B., Murakami, F. S., Noseda, M. D., Duarte, M. E. R., and Barreira, S. M. W. (2016). In vitro photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins. *Photochemical Photobiological Sciences*, 15(5):673-681.



## Capítulo 5

# Conclusão geral

A aplicação do efeito fotodinâmica atualmente é uma alternativa eficaz na inativação de bactérias, biofilmes microbianos e de fungos fitopatogénicos, embora com diferentes graus de eficiência. Tal como amplamente reportado na literatura, os biofilmes revelaram menor suscetibilidade à PDI do que as células planctónicas da mesma espécie. Estes resultados podem ser explicados pela presença de uma matriz polimérica extracelular auto-produzido composta principalmente por polissacarídeos, que podem dificultar a adsorção dos PS na superfície das células, bem como a penetração da luz (Sharma et al., 2008). As bactérias de Gram negativo e os fungos foram mais difíceis de inativar do que as bactérias de Gram positivo. Estes resultados podem ser devido a diferenças nas estruturas da membrana entre as três classes, a membrana externa de lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias de Gram negativo, que afetam a afinidade para o PS e protege as células da ação citotóxica do oxigénio singlete (Dahl et al., 1989). Assim, a inativação de biofilmes representa ainda um desafio que justifica a procura de fotossensibilizadores com melhores propriedades de penetração, adsorção e rendimento em espécies reativas de oxigénio. A curcumina, embora não tenha causado inativação completa de biofilmes de bactérias representativos de patogénicos alimentares, represente um elevado potencial como PS compatível com alimentos e cumpriu o requisito de 3 Log de redução da concentração de células viáveis. Pode, assim, ser considerada como um agente antimicrobiano fotodinâmico promissor para a inativação de microrganismos num contexto de segurança alimentar. No entanto, os PS naturais curcumina e riboflavina não se revelaram eficazes no controle de fungos potencialmente causadores de deterioração em frutos. Para esta aplicação, os PS sintéticos do grupo das porfirinas ou dos corantes podem representar uma

alternativa de baixo impacto ambiental, comparativamente com os tratamentos antifúngicos à base de cobre. Uma vez que a eficiência do processo depende da luz, o processo de inativação de fungos em condições de campo pode ser bastante mais lento do que outros tratamentos químicos, uma vez que pode haver recuperação da viabilidade do fundo durante o período da noite. Esta abordagem pode também vir a ter aplicação na desinfeção prévia de sementes, plântula e enxertos, que sendo conduzida com luz artificial, pode atingir melhores níveis de eficiência aumentando a intensidade da luz, de modo a aumentar a dose total mas reduzindo o tempo de aplicação.

Outros campos de aplicação do efeito fotodinâmico levantam outros constrangimentos, nomeadamente ao nível da formulação dos veículos/produtos de aplicação. Os testes realizados com um creme fotodinâmico contendo uma porfirina catiónica como fotossensibilizador revelaram que a consistência demasiado viscosa do creme reduz a sua eficiência relativamente à solução da mesma porfirina mas que reduzindo a viscosidade, melhorando o contacto do creme com as células e aumentando a dose de luz permite a inativação completa dos modelos bacterianos testados. Assim os cremes ou geis fotossensibilizadores podem vir a constituir uma alternativa viável aos tratamentos antibacterianos convencionais para o tratamento de infeções da pele, unhas e tecidos moles.

# Bibliografia

- Abraham, S. V. P. I., Palani, A., Ramaswamy, B. R., Shunmugiah, K. P., and Arumugam, V. R. (2011). Antiquorum sensing and antibiofilm potential of capparid spinosa. *Archives of Medical Research*, 42(8):658–668.
- Albini, A. and Fasani, E. (1998). *Drugs, Photochemistry and Photostability*, volume 225. Royal Society of Chemistry.
- Alenezi, K., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., and Benov, L. T. (2016). Optimizing zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photo-diagnosis and Photodynamic Therapy*.
- Ali, S. M., Khan, A. A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K. S., Polasa, H., Rao, L. V., Habibullah, C. M., Sechi, L. A., and Ahmed, N. (2005). Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen helicobacter pylori. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 4(1):1.
- Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M., Tom, A., and Neves, M. (2011). Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and environmental applications.
- Almeida, J., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Costa, L., Faustino, M. A., and Almeida, A. (2014). Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(4):626–633.
- Amaro, P. (2003). Manual técnico de protecção integrada da vinha na região norte. *Ed., Pedro Amaro, INIAP, Lisboa*.

- Ammon, H. P. and Wahl, M. A. (1991). Pharmacology of curcuma longa. *Planta Medica*, 57(01):1–7.
- Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., Tharakan, S. T., Misra, K., Priyadarsini, I. K., Rajasekharan, K. N., et al. (2008). Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. *Biochemical Pharmacology*, 76(11):1590–1611.
- Anderson, B. (2014). *Sistema Tegumentar* -. Number vol. 4. Elsevier Health Sciences Brazil.
- Araújo, E. A., Andrade, N., Carvalho, A., Ramos, A., Silva, C., and Silva, L. (2010). Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quim. Nova*, 33(9):1940–1948.
- Azeredo, J. and Oliveira, R. (2000). The role of exopolymers produced by sphingomonas paucimobilis in biofilm formation and composition. *Biofouling*, 16(1):17–27.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., and Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2):427–444.
- Baptista, A., Melo, L., Kato, I., Núñez, S., de Araujo, R., Ribeiro, M., et al. (2014). Efeito fotodinâmico da riboflavina associada a nanopartículas de prata em *Streptococcus mutans*.
- Bastos, M. M., Boechat, N., Gomes, A. T., Neves, M. G., and Cavaleiro, J. A. (2012). O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. *Revista Virtual de Química*, 4(3):257–267.
- Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M.-L., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M. (2008). Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology*, 26(11):612–621.
- Beech, I. B., Sunner, J. A., and Hiraoka, K. (2010). Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International microbiology*, 8(3):157–168.
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A., Tome, J. P., Neves, M. G., Tome, A. C., Almeida, A., and Cunha, A. (2014). Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. *Photochemistry and Photobiology*, 90(6):1387–1396.



- Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., and Stamford, N. P. (2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(4):195–215.
- Bianchi, D., Ingravalle, F., Adriano, D., Gallina, S., Gramaglia, M., Zuccon, F., Astegiano, S., Bellio, A., Macori, G., Ru, G., et al. (2014). Reproducibility study for the detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products between official italian national laboratories. *Journal of Food Protection*®, 77(6):999–1004.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., Consortium, L., et al. (2003). Comparison of the genome sequences of *listeria monocytogenes* and *listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3):207–213.
- Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., de Freitas, L. M., Fontana, C. R., and Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*, 21(3):342.
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., Capezzer, R., Sala, R., and Zane, C. (2004). Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 20(3):144–147.
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., and Sala, R. (2005). A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(1):1–6.
- Camino, D. A., Spesia, M. B., Pons, P., and Durantini, E. N. (2008). Mechanisms of *escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5, 10, 15, 20-tetra (4-n, n, n-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(9):1071–1078.
- Carmello, J. C., Alves, F., Basso, F. G., de Souza Costa, C. A., Bagnato, V. S., de Oliveira Mima, E. G., and Pavarina, A. C. (2016). Treatment of oral candidiasis using photodithazine®-mediated photodynamic therapy in vivo. *PloS One*, 11(6):e0156947.
- Carpentier, B. and Cerf, O. Persistence of *listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises.(2011). *Int J Food Microbiol*, 145(1):1–8.

- Chang, S.-T., Chen, P.-F., and Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1):123–127.
- Chen, B., Pogue, B. W., and Hasan, T. (2005). Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(3):477–487.
- Chen, C.-P., Hsieh, C.-M., Tsai, T., Yang, J.-C., and Chen, C.-T. (2015). Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue o for antimicrobial photodynamic inactivation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9):20859–20872.
- Climaco, P., Ricardo-da Silva, J. M., Laureano, O., de Castro, R., and Tonietto, J. (2012). O clima vitícola das principais regiões produtoras de uva para vinho de portugal. *Tonietto, Jorge; Sotés Ruiz, Vicente; Gómez-Miguel, Vicente D. Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas ibero-americanas*, pages 313–357.
- Correal, J. C., Marques, E. A., Guilherme, W. L., Leão, R. S., and Damasco, P. V. (2013). Infecções por staphylococcus aureus: mudança do perfil epidemiológico no hospital universitário pedro ernesto. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 12(3).
- Dahl, T. A., Midden, W., and Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*, 171(4):2188–2194.
- Dai, T., Huang, Y.-Y., and Hamblin, M. R. (2009). Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6(3):170–188.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4):414–430.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., and McLandsborough, L. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6):2950–2958.

- Donlan, R. M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, 17(2):66–72.
- Dovigo, L. N., Carmello, J. C., de Souza Costa, C. A., Vergani, C. E., Brunetti, I. L., Bagnato, V. S., and Pavarina, A. C. (2013). Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Medical Mycology*, 51(3):243–251.
- Eichner, A., Gollmer, A., Späth, A., Bäuml, W., Regensburger, J., König, B., and Maisch, T. (2015). Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin b2. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(2):387–396.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E., and Rimbach, G. (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22):5308–5332.
- Filoeche, S., Soma, K., and Sissons, C. (2005). Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(4):221–225.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The eps matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22):7945–7947.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623–633.
- Fracarolli, L., Rodrigues, G. B., Pereira, A. C., Júnior, N. S. M., Silva-Junior, G. J., Bachmann, L., Wainwright, M., Bastos, J. K., and Braga, G. U. (2016). Inactivation of plant-pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum* with natural plant-produced photosensitizers under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162:402–411.
- Freire, F., Viana, F., Cardoso, J., and dos SANTOS, A. (2004). Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do ceará. *Embrapa Agroindústria Tropical; Comunicado Técnico*, pages 1–6.
- Gelatti, L. C., Bonamigo, R. R., Becker, A. P., and d’Azevedo, P. A. (2009). Staphylococcus

- aureus resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol*, 84(5):501–6.
- George, S., Hamblin, M. R., and Kishen, A. (2009). Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(6):788–795.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., et al. (2015). Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Gong, N., Tan, Y., Li, M., Lu, W., and Lei, X. Ala-pdt combined with antibiotics for the treatment of multiple skin abscesses caused by *Mycobacterium fortuitum*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, pages 71–72.
- Gonzales, F. P., Da Silva, S. H., Roberts, D., Braga, G. U., et al. (2010). Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3):653–661.
- González-Delgado, J. A., Castro, P. M., Machado, A., Araújo, F., Rodrigues, F., Korsak, B., Ferreira, M., Tomé, J. P., and Sarmiento, B. (2016). Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1):221–231.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., et al. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324(5931):1190–1192.
- Grice, E. A. and Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4):244–253.
- Gunes, H., Gulen, D., Mutlu, R., Gumus, A., Tas, T., and Topkaya, A. E. (2014). Antibacterial effects of curcumin an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2):246–250.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4):322–332.

- Hora Machado, A. E. (2000). Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23(2).
- Hubbard, T., Backholer, L., Wiltshire, M., Cardigan, R., and Ariëns, R. A. (2015). Effects of riboflavin and amotosalen photoactivation systems for pathogen inactivation of fresh-frozen plasma on fibrin clot structure. *Transfusion*, 56(1):41–48.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., and Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular dna in staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2):470–476.
- Jori, G. (2006). Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1-2).
- Jori, G. and Brown, S. B. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5):403–405.
- Josefsen, L. and Boyle, R. (2008). Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology*, 154(1):1–3.
- Júnior, A. G., dos Santos, Á. F., and Auer, C. G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta*, 30(12):155–165.
- Kaplan, J. á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3):205–218.
- Knowles, J. and Roller, S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection*®, 64(10):1542–1548.
- Laczkowski, I. and Sousdaleff, M. (2013). Microencapsulação de curcumina com maltodextrina, avaliação da estabilidade e aplicação em alimentos. *Memories: VIII Encontro de Produção Científica e Tecnológica, Campo Mourão-PR*.
- Lazzeri, D., Rovera, M., Pascual, L., and Durantini, E. N. (2004). Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochemistry and Photobiology*, 80(2):286–293.

- Leanne B, J., Ross W, B., et al. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs*, 2008.
- Leavitt, G. (2003). The occurrence, distribution and control of *Botryodiplodia theobromae* on vitis vinifera in california, arizona and north mexico. In *Proceedings of the third International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Christchurch, New Zealand, 1–2 Feb 2003*.
- Lima, J., Moreira, R., Cardoso, J., MARTIN, M., and Viana, F. (2013). Caracterização cultural, morfológica e patogênica de lasiodiplodia theobromae associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathologica*, 39(2):81–88.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J., and Gray, M. J. (1967). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, 20(12):2255–2257.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J., and Olsen, A. M. (1961). The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection23.
- Luke-Marshall, N. R., Mang, T. S., Hansen, L. A., and Campagnari, A. A. (2014). Moraxella catarrhalis is susceptible to antimicrobial photodynamic therapy with photofrin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46(9):712–717.
- Luksiene, Z. and Brovko, L. (2013). Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Engineering Reviews*, 5(4):185–199.
- Luksiene, Z., Peciulyte, D., and Lugauskas, A. (2003). Inactivation of fungi in vitro by photosensitization: preliminary results. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 11(2):215–220.
- Machado, M. and Bettiol, W. (2010). Potencial para o biocontrole de botrytis cinerea por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45:539–545.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., and Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of aspergillus section nigri in wine grapes in argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37(2):179–184.

- Maisch, T., Eichner, A., Späth, A., Gollmer, A., König, B., Regensburger, J., and Bäuml, W. (2014). Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PloS One*, 9(12):e111792.
- Manoil, D., Filieri, A., Gameiro, C., Lange, N., Schrenzel, J., Wataha, J. C., and Bouillaguet, S. (2014). Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(3):372–379.
- Marotti, J., Aranha, A., Eduardo, C. d. P., and Ribeiro, M. S. (2008). Tratamento do herpes labial pela terapia fotodinâmica. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, 62(5):370–3.
- Melo, W. C. M. A. and Perussi, J. R. (2012). Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 33(3):331–340.
- Menezes, H. D., Pereira, A. C., Brancini, G. T., de Leão, H. C., Júnior, N. S. M., Bachmann, L., Wainwright, M., Bastos, J. K., and Braga, G. U. (2014a). Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 131:74–83.
- Menezes, H. D., Rodrigues, G. B., de Pádua Teixeira, S., Massola, N. S., Bachmann, L., Wainwright, M., and Braga, G. U. (2014b). In vitro photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5):1623–1632.
- Meng, X., Shi, Y., Ji, W., Meng, X., Zhang, J., Wang, H., Lu, C., Sun, J., and Yan, Y. (2011). Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23):8272–8279.
- Menoita, E., Santos, V., Testas, C., Gomes, C., and Santos, A. S. Biofilmes: Conhecer a entidade.
- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P. G., Johnson, M. G., and Rieke, S. C. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress

- response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(8):712–725.
- Moftah, N. H., Ibrahim, S. M., and Wahba, N. H. (2016). Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. *Archives of Dermatological Research*, 308(4):263–268.
- Moreno, L. Z., Paixao, R., Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Ferreira, T. P., Hofer, E., Matte, M. H., and Moreno, A. M. (2012). Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Research in Microbiology*, 163(4):268–271.
- Nakajima, M. and Akutsu, K. (2014). Virulence factors of botrytis cinerea. *Journal of General Plant Pathology*, 80(1):15–23.
- Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Hallenn, F., and Crous, P. (2006). *Botryosphaeria spp.* as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(4):43–54.
- Nielsen, H. K., Garcia, J., Væth, M., and Schlafer, S. (2015). Comparison of riboflavin and toluidine blue o as photosensitizers for photoactivated disinfection on endodontic and periodontal pathogens in vitro. *PloS One*, 10(10):e0140720.
- Nuryastuti, T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., and Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on icaa expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6850–6855.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., and Imanishi, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3):207–215.
- Oliveira, M. M. M. d., Brugnetra, D. F., and Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 69(3):277–284.
- Oliveri, C., Bella, P., Tessitori, M., Catara, V., and La Rosa, R. (2016). Grape and environmental mycoflora monitoring in old, traditionally cultivated vineyards on mount etna, southern italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.



- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., and Reynolds, J. V. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(1):14–29.
- Pereira, C. A., Romeiro, R. L., Costa, A. C. B. P., Machado, A. K. S., Junqueira, J. C., and Jorge, A. O. C. (2011). Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, 26(3):341–348.
- Pereira, M., Faustino, M., Tomé, J., Neves, M., Tome, A., Cavaleiro, J., Cunha, Â., and Almeida, A. (2014). Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(4):680–690.
- Peres, F. A. S., Teixeira, L. A. C., Yokoyama, L., Campos, J. C., and Miguel, M. A. L. (2008). Treatment of cooling water with hydrogen peroxide. *Química Nova*, 31(7):1851–1855.
- Perussi, J. R. (2007). Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 30(4):988.
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., and Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, 24(2):259–268.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12):20091–20112.
- Rabb, O. (1900). Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoren. *Zeitschrift für Biologie*, 39:524–526.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3):185–194.
- Renno, R. Z. and Miller, J. W. (2001). Photosensitizer delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52(1):63–78.
- Ribeiro, A. F. (2011). *Validação do sistema de HACCP em cook-chill numa empresa de catering*. PhD thesis, ISA/UTL.

- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7):603–632.
- Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Bechara, E., Di Mascio, P., and Martinez, G. R. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3):563–568.
- Rosa, M. C. and Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233:351–371.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M., and Ha, S. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4):491–509.
- Schilcher, K., Andreoni, F., Haunreiter, V. D., Seidl, K., Hasse, B., and Zinkernagel, A. S. (2016). Modulation of staphylococcus aureus biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10):5957–5967.
- Schlisselberg, D. B. and Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on salmonella typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food microbiology*, 35(1):65–72.
- Seo, H.-M., Min, H.-G., Kim, H.-J., Shin, J.-H., Nam, S.-H., Han, K.-S., Ryu, J.-H., Oh, J.-J., Kim, J. Y., Lee, K.-J., et al. (2016). Effects of repetitive photodynamic therapy using indocyanine green for acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 55(10):1157–1163.
- Sharma, M., Visai, L., Bragheri, F., Cristiani, I., Gupta, P. K., and Speziale, P. (2008). Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1):299–305.
- Silva, C. C. and Martins, R. d. A. (1996). A “nova teoria sobre luz e cores” de isaac newton: uma tradução comentada. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 18(4):313–27.
- Silva, E. P. and De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of listeria monocytogenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3):957–968.

- Silva Trentin, D., Giordani, R. B., and Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1. *Revista Liberato*, 14(22):213–236.
- Silvera-Pérez, A. E., Sanhueza, R. M. V., Duarte, V., Santos, H. P. d., and Felippeto, J. (2010). Controle do mofo cinzento com *clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology. Brasilia, DF. Vol. 35, p. 163-169*.
- Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4):573–583.
- Smijs, T. G., Mulder, A. A., Pavel, S., Onderwater, J. J., Koerten, H. K., and Bouwstra, J. A. (2008). Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. *Medical Mycology*, 46(4):315–325.
- Smijs, T. G., Pavel, S., Talebi, M., and Bouwstra, J. A. (2009). Preclinical studies with 5, 10, 15-tris (4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21h, 23h]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *trichophyton rubrum*. *Photochemistry and Photobiology*, 85(3):733–739.
- Souza, A. C. S., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., Cavagis, A. D. M., and Peppelenbosch, M. P. (2005). Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*, 28(5):887.
- Sperandio, F., Huang, Y.-Y., and R Hamblin, M. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 8(2):108–120.
- Spikes, J. D. (1985). The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In *Primary photo-processes in biology and medicine*, pages 209–227. Springer.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2):107–113.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., and Nakonieczna, J. (2012). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed research international*, 2013.

- Tavares, A., Carvalho, C., Faustino, M. A., Neves, M. G., Tomé, J. P., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Gomes, N., Alves, E., et al. (2010). Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Marine Drugs*, 8(1):91–105.
- Tavares, A., Dias, S. R., Carvalho, C. M., Faustino, M. A., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Gomes, N. C., et al. (2011). Mechanisms of photodynamic inactivation of a gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(10):1659–1669.
- Team, E. E. et al. (2013). The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 18(15):20449.
- Temba, B. A., Fletcher, M. T., Fox, G. P., Harvey, J. J., and Sultanbawa, Y. (2016). Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. *Food Control*, 59:708–713.
- Tetz, G. V., Artemenko, N. K., and Tetz, V. V. (2009). Effect of dnase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3):1204–1209.
- Thakuri, P., Joshi, R., Basnet, S., Pandey, S., Tadjale, S., and Mishra, N. (2011). Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. *Nepal Medical College Journal*, 13(4):281–284.
- Tonon, C. C., Paschoal, M. A., Correia, M., Spolidorio, D., Bagnato, V. S., Giusti, J., and Santos-Pinto, L. d. (2015). Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *The journal of contemporary dental practice*, 16(1):1–6.
- Torezan, L., Niwa, A. B. M., FESTA NETO, C., et al. (2009). Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84(5):445–459.

- Tortik, N., Spaeth, A., and Plaetzer, K. (2014). Photodynamic decontamination of foodstuff from staphylococcus aureus based on novel formulations of curcumin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(10):1402–1409.
- Usacheva, M., Teichert, M., Usachev, Y., Sievert, C., and Biel, M. (2008). Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(1):55–61.
- Van Houdt, R. and Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4):1117–1131.
- Van Kan, J. A., Stassen, J. H., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A., Faino, L., Farmer, A. D., Papasotiriou, D. G., Zhou, S., Seidl, M. F., Cottam, E., et al. (2016). A gapless genome sequence of the fungus botrytis cinerea. *Molecular Plant Pathology*.
- Vandresen, C. C., Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R. B., Murakami, F. S., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R., and Barreira, S. M. W. (2016). In vitro photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(5):673–681.
- Von Tappeiner, H. and Jesionek, A. (1903). Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Münch Med Wochenschr*, 47:2042–2044.
- Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (pact). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1):13–28.
- Wilkinson, F., Helman, W. P., and Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. an expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2):663–677.
- Winter, S., Tortik, N., Kubin, A., Krammer, B., and Plaetzer, K. (2013). Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(10):1795–1802.

- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S.-i., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., and Joh, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1):46–67.
- Yogo, T., Urano, Y., Ishitsuka, Y., Maniwa, F., and Nagano, T. (2005). Highly efficient and photostable photosensitizer based on bodipy chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 127(35):12162–12163.
- Zelickson, B. D. (2005). Mechanisms of action of topical aminolevulinic acid. *Photodynamic Therapy. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders*, pages 1–12.
- Zhang, L.-J., Zhang, X.-H., Liao, P.-Y., Sun, J.-J., Wang, L., Yan, Y.-J., and Chen, Z.-L. (2016). Antitumor activity evaluation of meso-tetra (pyrrolidine substituted) pentylporphin-mediated photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163:224–231.